

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091407** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.20

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.07

(54) СОСТАВ БЕССЫВОРОТОЧНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК И СПОСОБЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/596,766

(32) 2017.12.08

(33) US

(86) PCT/US2018/064627

(87) WO 2019/113556 2019.06.13

(71) Заявитель:
ДЖУНО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

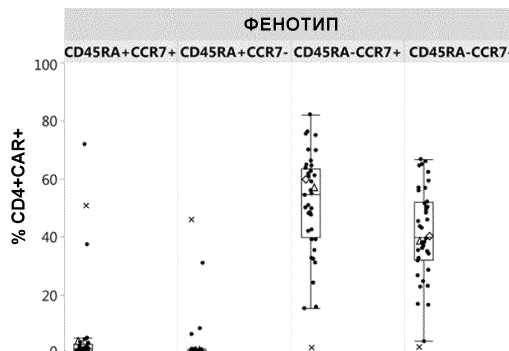
(72) Изобретатель:

Бошен Паскаль, Кхуу-Дуонг Кьен,
Аифува Айви, Чэн Кэлвин (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к бессывороточной среде для культивирования, например культивирования, получения и/или производства клеток, таких как иммунные клетки, такие как генетически модифицированные клетки. Изобретение также относится к жидким базальным средам и замороженным добавкам, которые могут использоваться для получения бессывороточной среды. Представленные варианты осуществления включают способы получения бессывороточных сред и способы культивирования клеток, например активации, трансдукции, культивирования или размножения клеток, в присутствии бессывороточной среды.



A1

202091407

202091407

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563434EA/032

СОСТАВ БЕССЫВОРОТОЧНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК И СПОСОБЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США 62/596,766, поданной 8 декабря 2017 года, озаглавленной "Состав бессывороточной среды для культивирования клеток и способы его применения", содержание которой полностью включено путем ссылки.

Включение списка последовательностей путем ссылки

[0002] Настоящая заявка подана вместе со Списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей предоставлен в файле под именем 735042012440SeqList.txt, созданном 7 декабря 2018 года, который имеет размер 50866 байтов. Информация в электронном формате Списка последовательностей полностью включена путем ссылки во всей полноте.

Область техники

[0003] Настоящее раскрытие относится к бессывороточным средам для культивирования, например, культивирования, получения и/или продукции клеток, таких как иммунные клетки, такие как генетически модифицированные клетки. Настоящее раскрытие также относится к жидким базальным средам и замороженным добавкам, которые могут использоваться для получения бессывороточных сред. Настоящее раскрытие также относится к способам получения бессывороточных сред и способам культивирования клеток, например, активации, трансдукции, культивирования или размножения клеток в присутствии бессывороточных сред.

Уровень техники

[0004] Различные способы клеточной терапии доступны для лечения заболеваний и состояний. Способы клеточной терапии включают способы с использованием иммунных клеток, таких как Т-клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором, таким как химерные антигенные рецепторы. Требуются улучшенные способы культивирования и получения таких клеточных терапий, в том числе для получения бессывороточных сред. Изобретение относится к композициям, способам и изделиям, которые удовлетворяют таким потребностям.

Сущность изобретения

[0005] Изобретение относится к бессывороточным средам для культивирования, получения и/или продукции клеток. В некоторых аспектах изобретение относится к бессывороточным средам, включающим: (a) от 0,5 мМ до 5 мМ дипептидной формы L-глутамина в базальной среде; (b) от 0,5 мМ до 5 мМ L-глутамин; и (c) по меньшей мере один белок, где среда не содержит сыворотку. В некоторых вариантах осуществления дипептидная форма L-глутамин представляет собой L-аланил-L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамин составляет от

или приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ, от 0,5 мМ до 4 мМ, от 0,5 мМ до 3 мМ, от 0,5 мМ до 2 мМ, от 0,5 мМ до 1 мМ, от 1 мМ до 5 мМ, от 1 мМ до 4 мМ, от 1 мМ до 3 мМ, от 1 мМ до 2 мМ, от 2 мМ до 5 мМ, от 2 мМ до 4 мМ, от 2 мМ до 3 мМ, от 3 мМ до 5 мМ, от 3 мМ до 4 мМ или от 4 мМ до 5 мМ, все включительно.

[0006] В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина в бессывороточной среде составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ или 5 мМ.

[0007] В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ.

[0008] В некоторых вариантах осуществления любой из бессывороточных сред согласно настоящему изобретению концентрация L-глутамина в бессывороточной среде составляет от или приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ, от 0,5 мМ до 4 мМ, от 0,5 мМ до 3 мМ, от 0,5 мМ до 2 мМ, от 0,5 мМ до 1 мМ, от 1 мМ до 5 мМ, от 1 мМ до 4 мМ, от 1 мМ до 3 мМ, от 1 мМ до 2 мМ, от 2 мМ до 5 мМ, от 2 мМ до 4 мМ, от 2 мМ до 3 мМ, от 3 мМ до 5 мМ, от 3 мМ до 4 мМ или от 4 мМ до 5 мМ, все включительно. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в бессывороточной среде составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ.

[0009] В некоторых вариантах осуществления любой из бессывороточных сред согласно настоящему изобретению по меньшей мере один белок не является белком немлекопитающего происхождения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является человеческим белком. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок включает один или более из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно один или более из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один альбумин, где альбумин необязательно является человеческим сывороточным альбумином или является рекомбинантным человеческим альбумином, и где концентрация альбумина в среде необязательно составляет приблизительно 2,5 мг/мл к 7,5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация альбумина в бессывороточной среде составляет приблизительно 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один трансферрин, где трансферрин необязательно является человеческим или является рекомбинантным человеческим альбумином, и где концентрация трансферрина в бессывороточной среде необязательно составляет приблизительно от 50 мг/л до 200 мг/л. В некоторых вариантах осуществления концентрация трансферрина в бессывороточной среде составляет приблизительно 100

мг/л. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один инсулин, где инсулин необязательно является человеческим или является рекомбинантным человеческим инсулином, и где концентрация инсулина в бессывороточной среде необязательно составляет приблизительно от 5 мг/л до 20 мг/л. В некоторых вариантах осуществления концентрация инсулина в бессывороточной среде составляет приблизительно 10 мг/л.

[010] В некоторых вариантах осуществления любой из бессывороточных сред согласно настоящему изобретению бессывороточная среда включает одно или более из неорганических солей, сахаров, аминокислот, необязательно также содержащих витамины, органические кислоты, антиоксиданты и/или буферы.

[011] В некоторых вариантах осуществления любой из бессывороточных сред согласно настоящему изобретению базальная среда включает среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальную поддерживающую среду (MEM), базальную среду Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальную поддерживающую среду Глазго (GMEM), альфа-модификацию минимальной поддерживающей среды (альфа-MEM), среду Дульбекко в модификации Искоува или M199.

[012] В некоторых вариантах осуществления любой из бессывороточных сред согласно настоящему изобретению базальная среда и/или бессывороточная среда не содержит феноловый красный.

[013] В некоторых вариантах осуществления любой из бессывороточных сред согласно настоящему изобретению бессывороточная среда включает липид, фактор роста, N-ацетилцистеин, этаноламин и/или альбумин. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда включает один или более цитокинов.

[014] В некоторых вариантах осуществления любой из бессывороточных сред согласно настоящему изобретению один или более цитокинов выбраны из IL-2, IL-7 или IL-15.

[015] В некоторых вариантах осуществления любой из бессывороточных сред согласно настоящему изобретению бессывороточная среда поддерживает экспансию клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки являются первичными иммунными клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой или включают Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки включают CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки.

[016] Изобретение относится к базальной среде, которая включает дипептидную форму L-глутамин, где базальная среда не содержит L-глутамин и белок. В некоторых вариантах осуществления дипептидная форма L-глутамин представляет собой L-аланил-L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамин составляет от или приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ, от 0,5 мМ до 4 мМ, от 0,5 мМ до 3 мМ, от 0,5 мМ до 2 мМ, от 0,5 мМ до 1 мМ, от 1 мМ до 5 мМ, от 1 мМ до 4 мМ, от 1 мМ до 3 мМ, от 1 мМ до 2 мМ, от 2 мМ до 5 мМ, от 2 мМ до 4 мМ, от 2 мМ до 3 мМ, от 3 мМ до 5 мМ, от 3 мМ до 4 мМ или от 4 мМ до 5 мМ, все включительно. В

некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамин в бессывороточной среде составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамин в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ.

[017] В некоторых вариантах осуществления любой базальной среды согласно настоящему изобретению базальная среда включает одно или более из неорганических солей, сахаров, аминокислот, необязательно также содержащих витамины, органические кислоты, антиоксиданты и/или буферы.

[018] В некоторых вариантах осуществления любой базальной среды согласно настоящему изобретению базальная среда включает среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальную поддерживающую среду (MEM), базальную среду Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальную поддерживающую среду Глазго (GMEM), альфа-модификации минимальной поддерживающей среды (альфа-MEM), среду Дульбекко в модификации Искоува или M199.

[019] В некоторых вариантах осуществления любой базальной среды согласно настоящему изобретению базальная среда не содержит феноловый красный.

[0020] В некоторых вариантах осуществления любой базальной среды согласно настоящему изобретению белок является человеческим белком и/или рекомбинантным белком.

[0021] В некоторых вариантах осуществления любой базальной среды согласно настоящему изобретению базальная среда является жидкостью.

[0022] Изобретение относится к добавкам, включающим по меньшей мере один белок и L-глутамин, где базальная среда для культивирования клеток в комбинации с добавкой способна поддерживать экспансию клетки. В некоторых вариантах осуществления добавку замораживают или хранят в замороженном состоянии до применения, необязательно при температуре от или приблизительно от -10°C до -30°C, необязательно при температуре 18°C или 20°C или приблизительно 18°C или 20°C. В некоторых вариантах осуществления L-глутамин в добавке не образует осадок при соединении с базальной средой и/или при размораживании добавки, или когда добавка подвергается температуре от или приблизительно от 20°C до 42°C, необязательно от или приблизительно от 20°C до 42°C, или при 37°C или больше чем или приблизительно 37°C. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамин в добавке составляет меньше 100 мМ. В некоторых вариантах осуществления L-глутамин в добавке составляет от или приблизительно от 20 мМ до 100 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамин в добавке составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ или 90 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамин в добавке составляет или приблизительно составляет 80 мМ. В некоторых вариантах

осуществления по меньшей мере один белок не является белком немлекопитающего происхождения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является человеческим белком. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок включает один или более из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно один или более из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один альбумин, где альбумин необязательно является человеческим сывороточным альбумином или является рекомбинантным человеческим альбумином.

[0023] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один трансферрин, где трансферрин необязательно получен от человека или является рекомбинантным человеческим трансферрином. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один инсулин, где инсулин необязательно является человеческим инсулином или рекомбинантным человеческим инсулином, и где концентрация инсулина в бессывороточной среде составляет приблизительно от 5 мг/л до 20 мг/л.

[0024] В некоторых вариантах осуществления любой из бессывороточных сред, базальной среды или добавки согласно настоящему изобретению бессывороточная среда, базальная среда или добавка является стерильной.

[0025] Изобретение относится к способам получения бессывороточной среды, где способ включает объединение базальной среды и добавки, например, в соответствии с предложенными базальными средами и добавками.

[0026] Изобретение относится к способам получения состава бессывороточной питательной среды, которые включают объединение: (a) базальной среды, включающей дипептидную форму L-глутамина, где бессывороточная базальная среда является жидким составом и/или не была заморожена до объединения; (b) первой добавки, включающей L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления первая добавка была заморожена до объединения, где способ необязательно включает размораживание первой добавки до объединения. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина в базальной среде составляет от или приблизительно от 0,5 mM до 5 mM, от 0,5 mM до 4 mM, от 0,5 mM до 3 mM, от 0,5 mM до 2 mM, от 0,5 mM до 1 mM, от 1 mM до 5 mM, от 1 mM до 4 mM, от 1 mM до 3 mM, от 1 mM до 2 mM, от 2 mM до 5 mM, от 2 mM до 4 mM, от 2 mM до 3 mM, от 3 mM до 5 mM, от 3 mM до 4 mM или от 4 mM до 5 mM, все включительно. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина в базальной среде составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM или 5 mM. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина в составе базальной среды составляет или приблизительно составляет 2 mM. В некоторых вариантах осуществления дипептидная форма L-глутамина

представляет собой L-аланил-L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в добавке составляет от или приблизительно от 20 мМ до 100 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в добавке составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ или 90 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в добавке составляет или приблизительно составляет 80 мМ.

[0027] В некоторых вариантах осуществления первая добавка (или добавка) включает по меньшей мере один белок, и причем по меньшей мере один присутствующий белок не является белком немлекопитающего. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок, присутствующий в первой добавке, включает человеческий белок. В некоторых вариантах осуществления человеческий белок включает человеческий сывороточный альбумин, человеческий трансферрин и/или человеческий рекомбинантный инсулин.

[0028] В некоторых вариантах осуществления состав бессывороточной среды включает от 90% до 97,5% (об/об) базальной среды и от 1,25% до 5% (об/об) первой добавки.

[0029] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает объединение: (с) второй добавки, включающей один или более компонентов, выбранных из группы, состоящей из одного или более антиоксидантов, одного или более альбуминов или заменителей альбумина, одного или более липидных веществ, одного или более инсулинов или заменителей инсулина, одного или более трансферринов или заменителей трансферрина, одного или более факторов роста, одного или более микроэлементов и одного или более глюкокортикоидов. В некоторых вариантах осуществления вторая добавка включает липид, фактор роста, N-ацетилцистеин, этаноламин и/или альбумин. В некоторых вариантах осуществления состав бессывороточной среды включает от 1,25% до 5% (об/об) второй добавки.

[0030] Изобретение относится к составам бессывороточных сред, полученным способом получения состава бессывороточной среды, например, в соответствии с предложенными способами.

[0031] Изобретение относится к способам культивирования клеток, где способ включает инкубацию композиции, включающей клетки в составе бессывороточной среды, например, в соответствии с предложенными составами бессывороточных сред. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят в комбинации с одной или более стадиями стадий, выбранных из активации клеток в присутствии стимулятора или условия; введение средства, кодирующего гетерологичный белок, необязательно рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор необязательно является химерным антигенным рецептором; или культивирование или экспансию клеток. В некоторых вариантах осуществления средство, включающее молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, является вирусным вектором,

необязательно лентивирусным вектором или гаммаретровирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления клетки являются первичными клетками, полученными у субъекта. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является рекомбинантным рецептором. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор является химерным антигенным рецептором.

[0032] Изобретение относится к способам получения модифицированных клеток, включающим: (а) контакт популяции клеток, включающей клетки, со средством, включающим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок, необязательно рекомбинантный рецептор, при условиях, обеспечивающих введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, в клетки в популяции; и (b) инкубацию клеток в присутствии стимулирующего условия, до, во время и/или после указанного контакта, где стимулирующее условие индуцирует первичный сигнал, сигнализацию, стимуляцию, активацию и/или экспансию клеток, где одну или обе из стадий (а) и (b) выполняют в составе бессывороточной среды, например, в соответствии с предложенными составами. В некоторых вариантах осуществления клетки являются первичными клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки являются иммунными клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки являются Т-клетками или обогащены Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки или обогащенные Т-клетки являются CD4⁺ Т-клетками и/или CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает, до стадии (а): выделение популяции клеток из биологического образца. В некоторых вариантах осуществления выделение включает отбор клеток на основе поверхностной экспрессии CD3 или на основе поверхностной экспрессии одного или оба из CD4 и CD8, необязательно положительный или отрицательный отбор. В некоторых вариантах осуществления выделение включает проведение иммуноаффинного отбора. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой или включает образец цельной крови, образец лейкоцитомоноцитарного слоя, образец мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), нефракционированный образец Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкоафереза. В некоторых вариантах осуществления CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки отдельно выделяют и объединяют до контакта или инкубирования, необязательно объединяют в отношении от 1:2 до 2:1 CD4 к CD8 клеткам, где отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1. В некоторых вариантах осуществления CD4⁺ Т-клетки выделяют и/или популяцию клеток обогащают CD4⁺ клетками. В некоторых вариантах осуществления CD8⁺ клетки выделяют и/или популяцию клеток обогащают CD8⁺ клетками. В некоторых вариантах осуществления суммарные Т-клетки, CD3⁺ клетки или CD4⁺ клетки и CD8⁺ клетки выделяют и/или популяцию клеток обогащают суммарными Т-клетками, CD3⁺ клетками или CD4⁺ и CD8⁺ клетками. В некоторых вариантах осуществления обогащенные клетки включают больше чем или больше чем приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% клеток. В некоторых вариантах осуществления средство, включающее

молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, является вирусным вектором, необязательно лентивирусным вектором или гаммаретровирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления клетки являются первичными клетками, полученными у субъекта. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок является рекомбинантным рецептором. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор является химерным антигенным рецептором.

[0033] В некоторых вариантах осуществления любого из способов получения модифицированных клеток, стимулирующее условие включает инкубацию со стимулирующим реагентом, способным 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. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент включает основное средство, которое специфично связывается с членом комплекса TCR, и дополнительное средство, которое специфично связывается с Т-клеточной костимулирующей молекулой. В некоторых вариантах осуществления основное средство специфично связывается с CD3, и/или костимулирующая молекула выбрана из группы, состоящей из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. В некоторых вариантах осуществления основные и дополнительные средства включают антитела и/или присутствуют на поверхности твердой подложки, необязательно сферы.

[0034] В некоторых вариантах осуществления любого из способов получения модифицированных клеток, стимуляцию клеток производят или иницируют до контакта, необязательно в течение 18-24 часов при температуре 37°C или приблизительно 37°C.

[0035] В некоторых вариантах осуществления любого из способов получения модифицированных клеток, стимулирующее условие включает цитокин, выбранный из IL-2, IL-15 и IL-7.

[0036] В некоторых вариантах осуществления любого из способов получения модифицированных клеток, стимуляцию клеток производят после контакта, необязательно в течение периода времени, позволяющего достичь пороговой концентрации.

[0037] В некоторых вариантах осуществления любого из способов культивирования клеток или получения модифицированных клеток, средство, включающее молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, является вирусным вектором, необязательно лентивирусным вектором или гаммаретровирусным вектором.

[0038] В некоторых вариантах осуществления любого из способов культивирования или получения модифицированных клеток, способ приводит по меньшей мере приблизительно к 5-кратной, 10-кратной, 20-кратной, 30-кратной, 40-кратной или 50-кратной или большей экспансии клеток по сравнению с количеством клеток при начале инкубирования. В некоторых вариантах осуществления экспансия клеток достигается после инкубирования в течение больше чем 5 дней, необязательно 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

[0039] В некоторых вариантах осуществления любого из способов культивирования или получения модифицированных клеток, способ приводит к клеткам, имеющим жизнеспособность выше чем приблизительно 80%, 85% или 90% после инкубации. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность присутствует после инкубации в течение больше чем 5 дней, необязательно 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

[0040] Изобретение относится к композициям клеток, полученным способом, например, в соответствии с предложенными способами.

[0041] Изобретение относится к изделиям, включающим бессывороточную среду, например, в соответствии с предложенными бессывороточными средами; базальную среду, например, в соответствии с предложенными в настоящем изобретении; или добавку, например, в соответствии с предложенными в настоящем изобретении, и инструкции по приготовлению или применению композиции. В некоторых вариантах осуществления изделие представляет собой контейнер, необязательно флакон.

Краткое описание чертежей

[0042] На **ФИГ. 1A-1D** показаны примерные фенотипические профили 40 композиций модифицированных CAR+ Т-клеток, каждая из которых получена от пациента с множественной миеломой. Профили экспрессии CD45RA×CCR7 композиций CAR+ Т-клеток показаны для CD4+ популяций (**ФИГ. 1A**) и CD8+ популяций (**ФИГ. 1B**). Профили экспрессии CD27×CD28 композиций CAR+ Т-клеток показаны для CD4+ популяций (**ФИГ. 1C**) и CD8+ популяций (**ФИГ. 1D**). Каждая композиция CAR+ Т-клеток обозначена точкой (□), крестом (×), ромбом (◇) или треугольником (Δ).

Подробное описание

[0043] Изобретение относится к бессывороточным средам для культивирования клеток, стимуляции размножения клеток и/или активации и/или получения генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления бессывороточные среды включают дипептидную форму L-глутамина, такую как L-аланил-L-глутамин, в базальной среде, свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин) и по меньшей мере один белок, где среда не содержит сыворотку. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда поддерживает жизнеспособность, экспансию и/или активацию клеток. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда ингибирует апоптоз клеток. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда способствует получению генетически модифицированных клеток. Также изобретение относится к базальным средам и добавкам, которые могут использоваться для получения бессывороточных сред. В некоторых вариантах осуществления базальная среда является жидкостью, включает дипептидную форму L-глутамина и не содержит L-глутамин, и, в некоторых случаях, белок. В некоторых вариантах осуществления добавка заморожена и включает L-глутамин, и, в некоторых случаях, по меньшей мере один белок. В некоторых вариантах осуществления одна или более дополнительных добавок могут быть добавлены для получения бессывороточной среды, включая добавки, содержащие по меньшей мере один белок. В некоторых из любых таких вариантов осуществления по меньшей мере

один белок является заменяющим сыворотку или замещающим сыворотку белком, таким как обычно человеческий белок или рекомбинантный или синтетический белок, например, альбумин. Также изобретение относится к способам получения состава бессывороточной среды. В некоторых вариантах осуществления способ включает объединение жидкой бессывороточной базальной среды, включающей дипептидную форму L-глутамин, с первой добавкой, включающей L-глутамин, где первую добавку хранят в замороженном виде и размораживают перед объединением. Изобретение также относится к способам культивирования клеток в бессывороточной среде и изделиям.

[0044] Различные среды доступны для культивирования клеток, таких как первичные иммунные клетки и генетически модифицированные клетки, применяемые в качестве клеточной терапии. Во многих случаях базальная среда с добавкой приблизительно 5% сыворотки (например, человеческой сыворотки) используется для культивирования этих клеток. Однако в некоторых случаях отдельные партии сыворотки (например, человеческой сыворотки) могут отличаться по своей способности поддерживать жизнеспособность, экспансию и/или активацию клеток. В некоторых случаях среды для культивирования клеток, включая бессывороточные среды, содержат L-глутамин, который является незаменимым питательным веществом в культурах клеток для выработки энергии, а также синтеза белка и нуклеиновых кислот. Однако L-глутамин в среде культивирования клеток спонтанно расщепляется и образует аммиак в качестве побочного продукта, который может быть токсичным для клеток и/или может влиять на гликозилирование белков и жизнеспособность клетки, что, в некоторых случаях, снижает продукцию белка и изменяет профили гликозилирования. Кроме того, L-глутамин часто производят в относительно высокой концентрации, например, в виде 200 мМ стокового раствора. При таких концентрациях L-глутамин может часто образовывать осадок при размораживании для применения и добавления в базальную среду.

[0045] Доступны другие различные формы L-глутамин, такие как дипептидная форма L-глутамин, включающая L-аланил-L-глутамин. В некоторых случаях такие дипептидные формы, например, L-аланил-L-глутамин, более стабильны в среде. Однако превращение дипептидной формы L-глутамин в свободную форму глутамин (т.е. L-глутамин) для использования требует затрат времени и/или энергии клетки. Кроме того, в некоторых случаях определенные популяции клеток, таких как иммунные клетки и генетически модифицированные клетки, могут иметь более высокую потребность в L-глутамине. В некоторых случаях, клетки в условиях экспансии, активированные клетки и/или генетически модифицированные клетки также могут иметь более высокую потребность в L-глутамине.

[0046] Преставленные варианты осуществления решают одну или более таких проблем. В конкретных вариантах осуществления предложенная бессывороточная среда содержит два источника глутамин, в частности: а) дипептидную форму глутамин (такую как L-аланил-L-глутамин) и б) свободную форму глутамин (т.е. L-глутамин). В конкретных вариантах осуществления свободная форма глутамин (т.е. L-глутамин)

является компонентом замороженной добавки для уменьшения и/или задержки разложения L-глутамина. В некоторых вариантах осуществления свободная форма глутамина (т.е. L-глутамин) является компонентом добавки, где концентрация L-глутамина в добавке составляет меньше 200 мМ (например, приблизительно 80 мМ), что, в некоторых аспектах, улучшает растворимость и предотвращает образование осадка L-глутамина, например, при добавлении в базальную среду. В некоторых аспектах предложенные бессывороточные среды, способы и применения обеспечивают преимущества для клеток, поскольку одновременно предоставлены два разных источника глутамина. В некоторых вариантах осуществления первый источник глутамина не является свободной формой глутамина и является стабилизированной формой глутамина. В некоторых вариантах осуществления первый источник глутамина является дипептидной формой глутамина, поскольку она является стабильной и может быть превращена в свободную форму глутамина. В некоторых вариантах осуществления второй источник глутамина является свободной формой глутамина (L-глутамином), которая может обеспечивать быструю и эффективную доставку глутамина.

[0047] В некоторых аспектах бессывороточные среды по изобретению получают из базальной среды, содержащей дипептидную форму глутамина. В некоторых аспектах базальная среда не содержит феноловый красный. В некоторых аспектах предложенные бессывороточные среды также получают с использованием добавки, содержащей свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин), для улучшения технологичности путем снижения количества добавок для получения полной среды. Включение дипептидной формы глутамина в базальную среду и/или включение свободной формы глутамина в добавку, в некоторых аспектах, может улучшить технологичность путем снижения количества добавок для получения полной среды. В некоторых аспектах добавку замораживают вскоре после того, как L-глутамин становится компонентом добавки, для повышения стабильности глутамина. Включение L-глутамина в добавку при концентрации меньше 200 мМ, например, приблизительно или 80 мМ, также полезно, поскольку это может улучшить растворимость и может исключить проблемы, связанные с образованием осадка.

[0048] В конкретных вариантах осуществления способы по изобретению включают культивирование определенной популяции или композиции клеток, содержащей клетки, такие как первичные иммунные клетки, например Т-клетки, с бессывороточной средой. В некоторых вариантах осуществления композиция клеток содержит иммунные клетки или обогащенную популяцию иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция клеток содержит первичные иммунные клетки или обогащенную популяцию иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция клеток содержит Т-клетки или обогащенную популяцию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция клеток содержит CD4+ Т-клетки или обогащенную популяцию CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция клеток содержит CD8+ Т-клетки или обогащенную популяцию CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах

осуществления композиция клеток включает клетки, которые подлежат генетической модификации или которые генетически модифицируют. В некоторых вариантах осуществления композиция клеток содержит или получена для содержания в ходе культивирования генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция клеток, которую культивируют в присутствии предложенной бессывороточной среды, содержит клетки, такие как первичные иммунные клетки, например Т-клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором или экспрессирующие рекомбинантный рецептор, такие как Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), или обогащенные CAR-экспрессирующие Т-клетки.

[0049] В конкретных вариантах осуществления способы по изобретению включают культивирование клеток в соответствии со способами получения генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления присутствие предложенной бессывороточной среды во время культивирования, например, в сочетании с активацией, трансдукцией, культивированием и/или экспансией иммунных клеток, например Т-клеток, сопоставимо и, в некоторых случаях, улучшает жизнеспособность, трансдукцию или экспансию клеток по сравнению с другими типами сред, таких как среды, содержащие сыворотку.

[0050] В некоторых аспектах бессывороточные среды, способы и применения по изобретению поддерживают требуемые эффекты в отношении клеток, которые, в некоторых случаях, улучшены по сравнению с культивированием в присутствии содержащих сыворотку сред. Например, в некоторых аспектах бессывороточные среды, способы и применения по изобретению поддерживают или способствуют жизнеспособности клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки имеют жизнеспособность, которая составляет больше чем приблизительно 80%, 85% или 90% после культивирования в составе бессывороточной среды, например, при условиях культивирования или экспансии, например, в течение приблизительно 5-6 дней. В некоторых случаях жизнеспособность может быть первоначально уменьшена, например, по сравнению с культивированием в содержащих сыворотку средах, но при этом оставшиеся живые клетки способны надежно размножаться в присутствии бессывороточной среды. В некоторых вариантах осуществления последующее культивирование в присутствии бессывороточной среды, например, в течение приблизительно 5 или 6 дней, приводит к сопоставимой или улучшенной жизнеспособности по сравнению со способом, в котором клетки культивировали с содержащей сыворотку средой. В некоторых аспектах культивирование клеток в присутствии предложенных бессывороточных сред уменьшает апоптоз клеток. В некоторых вариантах осуществления меньше чем приблизительно 20%, 15%, 10% или 5% клеток являются апоптотическими (например, имеют положительное окрашивание на каспазу 3) после культивирования в составе бессывороточной среды, например, в течение

приблизительно 5-6 дней.

[0051] В некоторых аспектах бессывороточные среды, способы и применения по изобретению поддерживают или вызывают экспансию клеток. В некоторых вариантах осуществления при культивировании в присутствии бессывороточной среды при условиях культивирования или экспансии, например, в присутствии одного или более цитокинов, клетки размножаются по меньшей мере приблизительно в 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз или 50 раз или более после культивирования в составе бессывороточной среды, например, после такого культивирования в течение приблизительно 5-6 дней. В некоторых аспектах предложенные бессывороточные среды приводят к сопоставимым или улучшенным способам получения генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления способы получения генетически модифицированных клеток в присутствии бессывороточной среды, например, в отношении активации, трансдукции или экспансии, приводят к получению по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65% или 70% клеток, экспрессирующих гетерологичный ген, такой как рекомбинантный рецептор, например, химерный антигенный рецептор. В некоторых аспектах способы и применения для культивирования клеток в присутствии бессывороточной среды приводят к композиции клеток с сопоставимой и, в некоторых случаях, улучшенной функцией по сравнению с клетками, полученными в среде, содержащей сыворотку. Такие функции включают улучшенные или сопоставимые эффекторные функции клеток, включая продукцию цитокинов и цитотоксическую активность против клеток-мишеней, например, после антигенспецифической стимуляции или контакта с клетками-мишенями. В некоторых аспектах клетки, такие как генетически модифицированные клетки, например, CAR-T-клетки, которые получены в процессе, включающем культивирование в присутствии бессывороточной среды, например, в отношении активации, трансдукции или экспансии клеток, приводят к композиции клеток с сопоставимой или улучшенной противоопухолевой активностью по сравнению с композицией клеток, полученной сопоставимым способом, но со средой, содержащей сыворотку.

[0052] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления, бессывороточные среды, способы и применения по изобретению приводят к более последовательному и менее изменчивому процессу с точки зрения количества времени, требуемого для получения модифицированных клеток из образцов, забранных у различных субъектов. В конкретных вариантах осуществления способы по изобретению обеспечивают успешное получение модифицированных Т-клеток, подходящих для клеточной терапии для высокого процента субъектов. В некоторых вариантах осуществления полученные композиции клеток содержат высокие или относительно высокие проценты здоровых клеток, например, клеток, которые жизнеспособны и/или не экспрессируют апоптотический маркер, высокие или относительно высокие проценты клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор и/или клеток с высокой или относительно высокой активностью, например цитотоксической, противоопухолевой, и/или продукцией

цитокинов, в ответ на стимуляцию антигеном. В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению обеспечивают процесс получения продуктов модифицированных клеток и, в некоторых аспектах, имеют конкретные показатели успеха, такие как высокие показатели успеха или показатели успеха, больше порогового уровня, такие как показатели успеха, которые способны обеспечивать получение терапевтических композиций клеток, например, способны обеспечивать получение таких композиций, обладающих некоторыми необходимыми или требуемыми свойствами, для большого количества или процента образцов, например, для всех или высокого процента образцов, каждый из которых получен у определенного отдельного субъекта или пациента, такого как субъект или пациент, подлежащий лечению терапевтической композицией (например, в контексте аутологичной клеточной терапии). В некоторых аспектах субъекты или пациенты имеют заболевание или состояние, такое как рак, такой как гемобластоз или гематологический рак, такой как множественная миелома. В некоторых аспектах образцы, из высокого процента которых можно получать терапевтические клеточные композиции, являются образцами пациентов, включая тех, которые являются изменчивыми, например, в отношении фенотипов клеток или других параметров их образцов или клеток. В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению обеспечивают получение композиций модифицированных Т-клеток, которые имеют улучшенные или высокие степени здоровья клеток по сравнению с композициями клеток, полученными с помощью других способов.

[0053] Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, упомянутые в настоящей заявке, полностью включены путем ссылки во всех отношениях, в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была отдельно включена путем ссылки. Если определение, представленное в настоящем описании, противоречит или иным образом не соответствует определению, изложенному в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в настоящее описание путем ссылки, определение, представленное в настоящем описании, имеет преимущественную силу по отношению к определению, которое включено в настоящее описание путем ссылки

[0054] Заголовки разделов, используемые в настоящем описании, служат исключительно в организационных целях и не должны рассматриваться как ограничение описанного изобретения.

I. Составы бессывороточных сред и соответствующие компоненты

[0055] Настоящая заявка относится к бессывороточным средам, содержащим синтетическую аминокислоту (например, дипептидную форму L-глутамина, например, L-аланил-L-глутамин), свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин) и по меньшей мере один белок. Настоящая заявка также относится к жидкой базальной среде, включающей по меньшей мере одну синтетическую аминокислоту (например, дипептидную форму L-глутамина, например, L-аланил-L-глутамин), где базальная среда не содержит свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин) и белок. Настоящая заявка также относится к

замороженной добавке, включающей свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин) и, в некоторых случаях, по меньшей мере один белок, такой как заменяющий сыворотку белок. Могут быть добавлены одна или более других добавок, включая одну или более добавок, содержащих по меньшей мере один белок, такой как заменяющий сыворотку белок, или один или более других компонентов, поддерживающих рост и экспансию клеток. В некоторых вариантах осуществления концентрация синтетической аминокислоты (например, дипептидной формы L-глутамина, например, L-аланил-L-глутамина) составляет приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ (например, 2 мМ). В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина составляет приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ (например, 2 мМ). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является человеческим белком или рекомбинантным белком, таким как заменяющим сыворотку белком, например, альбумином. В некоторых вариантах осуществления бессывороточные среды дополнительно включают один или более цитокинов (таких как IL-2, IL-7 или IL-15). В некоторых вариантах осуществления бессывороточные среды не содержат феноловый красный.

[0056] В некоторых вариантах осуществления бессывороточные среды по изобретению получены или приготовлены из жидкой базальной среды и одной или более добавок.

[0057] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к жидкой базальной среде, содержащей синтетическую аминокислоту, которая может превращаться в L-глутамин в клеточной культуре, такую как синтетическая аминокислота, которая является дипептидной формой L-глутамина, например, L-аланил-L-глутамином. В некоторых случаях базальная среда не содержит L-глутамин и белок. В некоторых вариантах осуществления концентрация синтетической аминокислоты (например, дипептидной формы L-глутамина, например, L-аланил-L-глутамина) составляет приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ (например, 2 мМ). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является человеческим белком и/или рекомбинантным белком. В некоторых вариантах осуществления базальная среда не содержит феноловый красный.

[0058] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к добавке, включающей по меньшей мере один белок и свободную форму глутамина, например, L-глутамин, где добавка заморожена или была заморожена после того, как L-глутамин становится ее компонентом. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в добавке составляет меньше 200 мМ, например, меньше 150 мМ, 100 мМ или меньше, например, от 20 мМ до 120 мМ или от 40 мМ до 100 мМ, например, 80 мМ или приблизительно 80 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина после объединения добавки с базальной средой составляет от приблизительно 0,5 мМ до приблизительно 5 мМ (например, 2 мМ). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок не является белком немлекопитающего происхождения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок

является человеческим белком или белком человеческого происхождения или является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок включает альбумин, например, человеческий или рекомбинантный человеческий альбумин.

А. Базальная среда

[0059] В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислота включает аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аспарагин, серин, глутамин, гистидин, глицин, треонин, аргинин, аланин, тирозин, цистеин, валин, метионин, норвалин, триптофан, фенилаланин, изолейцин, лейцин, лизин, гидроксипролин, саркозин и/или пролин.

[0060] В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает по меньшей мере одну синтетическую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота может превращаться в свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин) в клеточной культуре, включающей клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка включает клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка включает иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка является генетически модифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является генетически модифицированной Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка генетически модифицирована для экспрессии рекомбинантного рецептора (например, химерного антигенного рецептора). В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR).

[0061] В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота является стабилизированной формой глутамина (т.е. L-глутамина). В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота более стабильна, чем глутамин (т.е. L-глутамин) в водном растворе (например, базальной среде). В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество глутамина в базальной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество глутамина (т.е. L-глутамина) в течение по меньшей мере приблизительно 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 14 дней в базальной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество глутамина (т.е. L-глутамина) в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель в базальной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество глутамина (т.е. L-глутамина) в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев в базальной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество глутамина (т.е. L-глутамина) в течение по меньшей

мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет в базальной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере приблизительно 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 14 дней в базальной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель в базальной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев в базальной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет в базальной среде.

[0062] В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота растворима в водном растворе (например, базальной среде). В некоторых вариантах осуществления растворимость синтетической аминокислоты в водном растворе выше, чем у свободной формы глутамина (т.е. L-глутамина).

[0063] В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота способна к транспорту в клетку, где она может превращаться в свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления клетка включает иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка является генетически модифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клеткой является генетически модифицированной Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка генетически модифицирована для экспрессии рекомбинантного рецептора (например, химерного антигенного рецептора). В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR).

[0064] В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота представляет собой дипептид. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота представляет собой трипептид. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота является дипептидной формой L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамином).

[0065] В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в базальной среде составляет приблизительно от 0,5 мМ-5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамин) в базальной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ-1 мМ, 0,5 мМ-1,5 мМ, 0,5 мМ-2 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-4 мМ, 0,5 мМ-4,5 мМ, 0,5 мМ-5 мМ,

1 mM-1,5 mM, 1 mM-2 mM, 1 mM-2,5 mM, 1 mM-3 mM, 1 mM-3,5 mM, 1 mM-4 mM, 1 mM-4,5 mM, 1 mM-5 mM, 1,5 mM-2 mM, 1,5 mM-2,5 mM, 1,5 mM-3 mM, 1,5 mM-3,5 mM, 1,5 mM-4 mM, 1,5 mM-4,5 mM, 1,5 mM-5 mM, 2 mM-2,5 mM, 2 mM-3 mM, 2 mM-3,5 mM, 2 mM-4 mM, 2 mM-4,5 mM, 2 mM-5 mM, 2,5 mM-3 mM, 2,5 mM-3,5 mM, 2,5 mM-4 mM, 2,5 mM-4,5 mM, 2,5 mM-5 mM, 3 mM-3,5 mM, 3 mM-4 mM, 3 mM-4,5 mM, 3 mM-5 mM, 3,5 mM-4 mM, 3,5 mM-4,5 mM, 3,5 mM-5 mM, 4 mM-4,5 mM, 4 mM-5 mM или 4,5 mM-5 mM, все включительно. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в базальной среде составляет или приблизительно составляет 5 mM-7,5 mM, 5 mM-10 mM, 5 mM-12,5 mM, 5 mM-15 mM, 5 mM-17,5 mM, 5 mM-20 mM, 7,5 mM-10 mM, 7,5 mM-12,5 mM, 7,5 mM-15 mM, 7,5 mM-17,5 mM, 7,5 mM-20 mM, 10 mM-12,5 mM, 10 mM-15 mM, 10 mM-17,5 mM, 10 mM-20 mM, 12,5 mM-15 mM, 12,5 mM-17,5 mM, 12,5 mM-20 mM, 15 mM-17,5 mM, 15 mM-20 mM или 17,5 mM-20 mM, все включительно. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в базальной среде составляет по меньшей мере или приблизительно 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM, 4,5 mM или 5 mM. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в базальной среде составляет или приблизительно составляет 2 mM. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в базальной среде составляет самое большее или приблизительно 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM, 4,5 mM, 5 mM, 5,5 mM, 6 mM, 6,5 mM, 7 mM, 7,5 mM, 8 mM, 8,5 mM, 9 mM, 9,5 mM, 10 mM, 12,5 mM, 15 mM, 17,5 mM или 20 mM.

[0066] В некоторых вариантах осуществления базальная среда не включает L-глютамин или не включает существенное количество L-глутамина. В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает L-глютамин. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в базальной среде составляет или приблизительно составляет или меньше чем или приблизительно 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM или 0,5 mM. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в базальной среде составляет или приблизительно составляет или меньше чем или приблизительно 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM или 5 mM.

[0067] В некоторых вариантах осуществления одну или более аминокислот, включающих по меньшей мере одну синтетическую аминокислоту, которая может превращаться в свободную форму глутамина (т.е. L-глютамин), например, дипептидную форму L-глутамина, такую как L-аланил-L-глютамин, предоставляют в базальной среде. В некоторых вариантах осуществления базальная среда является искусственной или синтетической средой. В некоторых вариантах осуществления базальная среда является сбалансированным солевым раствором (например, PBS, DPBS, HBSS, EBSS). В некоторых вариантах осуществления базальная среда выбрана из среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальной поддерживающей среды (MEM), базальной среды Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальной поддерживающей среды Глазго (GMEM),

альфа-модификации минимальной поддерживающей среды (альфа-MEM), среды Дульбекко в модификации Искоува и M199. В некоторых вариантах осуществления базальная среда является комплексной средой (например, RPMI-1640, IMDM). В некоторых вариантах осуществления базальная среда является базальной средой для экспансии Т-клеток OpTmizer™ CTS™ (ThermoFisher).

[0068] В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает питательную смесь неорганических солей, сахаров, аминокислот, необязательно также содержащих витамины, органические кислоты, антиоксиданты и/или буферы.

[0069] В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает CO_2 и HCO_3 . В некоторых вариантах осуществления содержание CO_2/HCO_3 в базальной среде уравновешено газообразным CO_2 (например, 5-10%), поддерживающим, таким образом, оптимальный pH в среде. В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает цвиттерион, HEPES. В некоторых вариантах осуществления базальная среда содержит феноловый красный. В некоторых вариантах осуществления базальная среда не содержит феноловый красный.

[0070] В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает неорганическую соль. В некоторых вариантах осуществления неорганическая соль обеспечивает осмотический баланс. В некоторых вариантах осуществления неорганическая соль регулирует мембранный потенциал, предоставляя ионы натрия, калия и кальция.

[0071] В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает один или более углеводов. В некоторых вариантах осуществления углевод включает глюкозу. В некоторых вариантах осуществления углевод включает галактозу. В некоторых вариантах осуществления углевод включает мальтозу. В некоторых вариантах осуществления углевод включает фруктозу.

[0072] В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает жирную кислоту. В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает липид. В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает витамин (например, витамин А, витамин В7, витамин В9, витамин В12, витамин С, витамин Е). В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает микроэлемент. В некоторых вариантах осуществления микроэлемент включает медь. В некоторых вариантах осуществления микроэлемент включает цинк. В некоторых вариантах осуществления микроэлемент включает селен. В некоторых вариантах осуществления микроэлемент включает промежуточное соединение трикарбоновой кислоты.

[0073] В некоторых вариантах осуществления базальная среда содержит смесь неорганических солей, сахаров, аминокислот и, необязательно, витаминов, органических кислот и/или буферов, или других известных питательных веществ для культур клеток. В дополнение к питательным веществам среда также способствует поддержанию pH и осмоляльности. В некоторых аспектах реагенты базальной среды поддерживают рост, пролиферацию и/или экспансию клеток. Различные доступные в продаже базальные среды

известны специалистам в данной области и включают среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), среду Мемориального Института Розуэлла Парка (RPMI), среду Дульбекко в модификации Искоува и среду Хэма. В некоторых вариантах осуществления базальная среда является средой Дульбекко в модификации Искоува, RPMI-1640 или α -MEM.

[0074] В некоторых вариантах осуществления базальная среда не содержит белок. В некоторых вариантах осуществления базальная среда не содержит человеческий белок (например, человеческий сывороточный белок). В некоторых вариантах осуществления базальная среда является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления базальная среда не содержит сыворотку, полученную у человека. В некоторых вариантах осуществления базальная среда не содержит рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления базальная среда не содержит человеческий белок и рекомбинантный белок.

[0075] В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает белок или пептид. В некоторых вариантах осуществления белок является альбумином или заменителем альбумина. В некоторых вариантах осуществления альбумин является альбумином человеческого происхождения. В некоторых вариантах осуществления альбумин является рекомбинантным альбумином. В некоторых вариантах осуществления альбумин является природным человеческим сывороточным альбумином. В некоторых вариантах осуществления альбумин является рекомбинантным человеческим сывороточным альбумином. В некоторых вариантах осуществления альбумин является рекомбинантным альбумином из нечеловеческого источника. Заменители альбумина могут быть любым источником белка или полипептида. Примеры таких образцов белка или полипептида включают, без ограничения перечисленными, экстракт бычьего гипофиза, растительный гидролизат (например, рисовый гидролизат), фетальный телячий альбумин (фетуин), яичный альбумин, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) или другие животные альбумины, куриный эмбриональный экстракт, бычий эмбриональный экстракт, AlbuMAX® I и AlbuMAX® II. В некоторых вариантах осуществления белок или пептид включает трансферрин. В некоторых вариантах осуществления белок или пептид включает фибронектин. В некоторых вариантах осуществления белок или пептид включает апротинин. В некоторых вариантах осуществления белок включает фетуин.

[0076] В некоторых вариантах осуществления базальная среда (например, базальная среда) представляет собой жидкий состав. В некоторых вариантах осуществления базальная среда (например, базальная среда) не была заморожена, или было указано не замораживать ее (например, согласно протоколу) перед предполагаемым применением. В некоторых вариантах осуществления базальную среду хранят при температуре от 2°C до 8°C или приблизительно от 2°C до 8°C. В некоторых вариантах осуществления базальную среду хранят при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления базальная среда стабильна в течение по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель в случае хранения при температуре от 2°C до

8°C. В некоторых вариантах осуществления базальная среда стабильна в течение по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев в случае хранения при температуре от 2°C до 8°C.

В. Добавка

[0077] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к добавке, такой как первая добавка, включающая свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления такую добавку замораживают до применения и/или добавляют в базальную среду. В некоторых вариантах осуществления добавка, такая как описанные в настоящем описании, предназначена для применения в качестве добавки для среды (например, добавки для базальной среды). В некоторых вариантах осуществления первая добавка предназначена для применения в качестве добавки для поддержания, экспансии и/или активации клетки. В некоторых вариантах осуществления первая добавка предназначена для применения в качестве добавки для экспансии клетки. В некоторых вариантах осуществления первая добавка включает замороженную добавку, включающую по меньшей мере один белок и свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин), где базальная среда для культивирования клеток, содержащая первую добавку, способна поддерживать экспансию клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка является первичной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является CD4 Т-клеткой или CD8 Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления клетка является первичной иммунной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления клетка является генетически модифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является генетически модифицированной клеткой, полученной у человека. В некоторых вариантах осуществления клетка является генетически модифицированной Т-клеткой (например, Т-клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR)) человека.

[0078] В некоторых вариантах осуществления первую добавку хранят или рекомендуют хранить при температуре от -20°C или приблизительно -20°C до 0°C или приблизительно 0°C перед ее надлежащим применением. В некоторых вариантах осуществления добавку хранят или рекомендуют хранить при температуре меньше чем приблизительно 0°C. В некоторых вариантах осуществления добавку замораживают сразу или вскоре после того, как свободная форма глутамина (т.е. L-глутамин) становится ее компонентом, до момента применения добавки согласно ее предполагаемому применению. В некоторых вариантах осуществления добавка заморожена в течение большей части времени после того, как свободная форма глутамина (т.е. L-глутамин) становится ее компонентом, до момента применения добавки согласно ее предполагаемому применению. В некоторых вариантах осуществления добавку не хранят

в виде жидкости в течение больше чем 1, 2, 3, 4, 5, 6 или спустя 7 дней после того, как свободная форма глутамин (т.е. L-глутамин) становится ее компонентом, до момента применения добавки согласно ее предполагаемому применению. В некоторых вариантах осуществления добавку не хранят в виде жидкости в течение больше чем или больше чем приблизительно 4, 8, 12, 16, 20 или 24 часов после того, как свободная форма глутамин (т.е. L-глутамин) становится ее компонентом, до момента применения добавки согласно ее предполагаемому применению. В некоторых вариантах осуществления добавка заморожена в течение большей части времени до и после того, как свободная форма глутамин (т.е. L-глутамин) становится ее компонентом, до момента применения добавки согласно ее предполагаемому применению. В некоторых вариантах осуществления добавка находится при комнатной или более низкой температуре (например, температура добавки ниже или ниже чем приблизительно 20°C, 15°C, 10°C, 5°C или 0°C), когда свободная форма глутамин (т.е. L-глутамин) становится компонентом добавки.

[0079] В некоторых вариантах осуществления L-глутамин в добавке не образует осадок при размораживании добавки. В некоторых вариантах осуществления L-глутамин в добавке не образует осадок, когда добавка является жидкостью. В некоторых вариантах осуществления L-глутамин в добавке не образует осадок при размораживании добавки при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамин в добавке составляет или приблизительно составляет или меньше чем или меньше чем приблизительно 200 мМ, 180 мМ, 160 мМ, 140 мМ, 120 мМ, 100 мМ или 80 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамин в добавке составляет от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 30 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 50 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 70 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 90 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 110 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 130 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 170 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 50 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 70 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 90 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 110 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 130 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 170 мМ, от или от приблизительно 50 мМ до или до приблизительно 70 мМ, от или от приблизительно 50 мМ до или до приблизительно 90 мМ, от или от приблизительно 50 мМ до или до приблизительно 110 мМ, от или от приблизительно 50 мМ до или до приблизительно 130 мМ, от или от приблизительно 50 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 50 мМ до или до приблизительно 170 мМ, от или от приблизительно 70 мМ до или до приблизительно 90 мМ, от или от приблизительно 70 мМ до или до приблизительно 110 мМ, от или от приблизительно 70 мМ до или до

приблизительно 130 мМ, от или от приблизительно 70 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 70 мМ до или до приблизительно 170 мМ, от или от приблизительно 90 мМ до или до приблизительно 110 мМ, от или от приблизительно 90 мМ до или до приблизительно 130 мМ, от или от приблизительно 90 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 90 мМ до или до приблизительно 170 мМ, от или от приблизительно 110 мМ до или до приблизительно 130 мМ, от или от приблизительно 110 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 110 мМ до или до приблизительно 170 мМ, от или от приблизительно 130 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 130 мМ до или до приблизительно 170 мМ или от или от приблизительно 150 мМ до или до приблизительно 170 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамин в добавке составляет приблизительно 80 мМ.

[0080] В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамин (т.е. L-глутамин) в добавке является такой, что после объединения добавки с базальной средой (такой как среды, описанные в настоящем описании), концентрация свободной формы глутамин (т.е. L-глутамин) в среде составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ-5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамин (т.е. L-глутамин) в базальной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамин (т.е. L-глутамин) составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ-1 мМ, 0,5 мМ-1,5 мМ, 0,5 мМ-2 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-4 мМ, 0,5 мМ-4,5 мМ, 0,5 мМ-5 мМ, 1 мМ-1,5 мМ, 1 мМ-2 мМ, 1 мМ-2,5 мМ, 1 мМ-3 мМ, 1 мМ-3,5 мМ, 1 мМ-4 мМ, 1 мМ-4,5 мМ, 1 мМ-5 мМ, 1,5 мМ-2 мМ, 1,5 мМ-2,5 мМ, 1,5 мМ-3 мМ, 1,5 мМ-3,5 мМ, 1,5 мМ-4 мМ, 1,5 мМ-4,5 мМ, 1,5 мМ-5 мМ, 2 мМ-2,5 мМ, 2 мМ-3 мМ, 2 мМ-3,5 мМ, 2 мМ-4 мМ, 2 мМ-4,5 мМ, 2 мМ-5 мМ, 2,5 мМ-3 мМ, 2,5 мМ-3,5 мМ, 2,5 мМ-4 мМ, 2,5 мМ-4,5 мМ, 2,5 мМ-5 мМ, 3 мМ-3,5 мМ, 3 мМ-4 мМ, 3 мМ-4,5 мМ, 3 мМ-5 мМ, 3,5 мМ-4 мМ, 3,5 мМ-4,5 мМ, 3,5 мМ-5 мМ, 4 мМ-4,5 мМ, 4 мМ-5 мМ или 4,5 мМ-5 мМ, все включительно. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамин (т.е. L-глутамин) в базальной среде составляет или приблизительно составляет 5 мМ-7,5 мМ, 5 мМ-10 мМ, 5 мМ-12,5 мМ, 5 мМ-15 мМ, 5 мМ-17,5 мМ, 5 мМ-20 мМ, 7,5 мМ-10 мМ, 7,5 мМ-12,5 мМ, 7,5 мМ-15 мМ, 7,5 мМ-17,5 мМ, 7,5 мМ-20 мМ, 10 мМ-12,5 мМ, 10 мМ-15 мМ, 10 мМ-17,5 мМ, 10 мМ-20 мМ, 12,5 мМ-15 мМ, 12,5 мМ-17,5 мМ, 12,5 мМ-20 мМ, 15 мМ-17,5 мМ, 15 мМ-20 мМ или 17,5 мМ-20 мМ, все включительно. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамин (т.е. L-глутамин) в базальной среде составляет по меньшей мере или приблизительно 0,5 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамин (т.е. L-глутамин) в базальной среде составляет самое большее или приблизительно 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ, 5 мМ, 5,5 мМ, 6 мМ, 6,5 мМ, 7 мМ, 7,5 мМ, 8 мМ, 8,5 мМ, 9 мМ, 9,5 мМ, 10 мМ, 12,5 мМ, 15 мМ, 17,5 мМ или 20 мМ.

[0081] В некоторых вариантах осуществления первая добавка содержит один или более дополнительных компонентов. В некоторых вариантах осуществления другая добавка, такая как вторая добавка, предоставлена для обеспечения одного или более дополнительных компонентов. В некоторых вариантах осуществления добавки, первую добавку и необязательно одну или более других добавок, например, вторую добавку, объединяют с базальными средами для введения одного или более дополнительных компонентов в базальные среды.

[0082] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают по меньшей мере один белок. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок не является белком немлекопитающего происхождения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является человеческим или получен у человека. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок включает альбумин, трансферрин, инсулин, фибронектин, апротинин или фетуин. В некоторых вариантах осуществления белок включает один или более из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно один или более из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

[0083] В некоторых вариантах осуществления белок является альбумином или заменителем альбумина. В некоторых вариантах осуществления альбумин является человеческим альбумином. В некоторых вариантах осуществления альбумин является рекомбинантным альбумином. В некоторых вариантах осуществления альбумин является природным человеческим сывороточным альбумином. В некоторых вариантах осуществления альбумин является рекомбинантным человеческим сывороточным альбумином. В некоторых вариантах осуществления альбумин является рекомбинантным альбумином из нечеловеческого источника. Заменители альбумина могут быть любым источником белка или полипептида. Примеры таких образцов белка или полипептида включают, без ограничения, экстракт бычьего гипофиза, растительный гидролизат (например, рисовый гидролизат), фетальный телячий альбумин (фетуин), яичный альбумин, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) или другие животные альбумины, куриный эмбриональный экстракт, бычий эмбриональный экстракт, AlbuMAX® I и AlbuMAX® II.

[0084] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают альбумин. В некоторых вариантах осуществления альбумин является человеческим альбумином или получен из человеческого альбумина. В некоторых вариантах осуществления альбумин получен из человеческой сыворотки или человеческой плазмы. В некоторых вариантах осуществления альбумин является рекомбинантным альбумином. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный альбумин получен у человека. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный альбумин не получен у человека. В некоторых вариантах осуществления добавка

включает природный альбумин. В некоторых вариантах осуществления природный альбумин получен у человека. В некоторых вариантах осуществления природный альбумин не получен у человека. В некоторых вариантах осуществления концентрация альбумина в добавке является такой, что после объединения добавки с базальной средой (такой как среды, описанные в настоящем описании), концентрация альбумина в среде составляет от или от приблизительно 0 мг/мл до или до приблизительно 2 мг/мл, от или от приблизительно 0 мг/мл до или до приблизительно 4 мг/мл, от или от приблизительно 0 мг/мл до или до приблизительно 6 мг/мл, от или от приблизительно 0 мг/мл до или до приблизительно 8 мг/мл, от или от приблизительно 0 мг/мл до или до приблизительно 10 мг/мл, от или от приблизительно 0 мг/мл до или до приблизительно 12 мг/мл, от или от приблизительно 2 мг/мл до или до приблизительно 4 мг/мл, от или от приблизительно 2 мг/мл до или до приблизительно 6 мг/мл, от или от приблизительно 2 мг/мл до или до приблизительно 8 мг/мл, от или от приблизительно 2 мг/мл до или до приблизительно 10 мг/мл, от или от приблизительно 2 мг/мл до или до приблизительно 12 мг/мл, от или от приблизительно 4 мг/мл до или до приблизительно 6 мг/мл, от или от приблизительно 4 мг/мл до или до приблизительно 8 мг/мл, от или от приблизительно 4 мг/мл до или до приблизительно 10 мг/мл, от или от приблизительно 4 мг/мл до или до приблизительно 12 мг/мл, от или от приблизительно 6 мг/мл до или до приблизительно 8 мг/мл, от или от приблизительно 6 мг/мл до или до приблизительно 10 мг/мл, от или от приблизительно 6 мг/мл до или до приблизительно 12 мг/мл, от или от приблизительно 8 мг/мл до или до приблизительно 10 мг/мл, от или от приблизительно 8 мг/мл до или до приблизительно 12 мг/мл, от или от приблизительно 10 мг/мл до или до приблизительно 12 мг/мл или от или от приблизительно 10 мг/мл до или до приблизительно 15 мг/мл, все включительно. В некоторых вариантах осуществления концентрация альбумина в среде составляет или приблизительно составляет 5 мг/мл.

[0085] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают трансферрин или заменитель трансферрина. В некоторых вариантах осуществления заменитель трансферрина представляет собой соединение, которое может заменять трансферрин в добавке с получением по существу таких же результатов, как с трансферрином. Примеры заменителей трансферрина включают, без ограничения, любое железохелатное соединение. Железохелатные соединения, которые могут использоваться, включают, без ограничения перечисленными, хелаты железа и этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), этиленгликоль-бис(β-аминоэтилэфир)-N, N,N',N'-тетрауксусной кислоты (ЭГТА), дефероксамин мезилата, димеркаптопропанола, диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПА) и транс-1,2-диаминоциклогексан-N, N,N',N'-тетрауксусной кислоты (ЦДТА), а также хелат цитрата железа и хелат сульфата железа. В некоторых вариантах осуществления трансферрин является насыщенным железом трансферрином. В некоторых вариантах осуществления трансферрин является насыщенным железом человеческим трансферрином.

[0086] В некоторых вариантах осуществления трансферрин или заменитель

[illegible]

[illegible]

450 мг/л до или до приблизительно 550 мг/л, от или от приблизительно 450 мг/л до или до приблизительно 600 мг/л, от или от приблизительно 450 мг/л до или до приблизительно 650 мг/л, от или от приблизительно 450 мг/л до или до приблизительно 750 мг/л, от или от приблизительно 500 мг/л до или до приблизительно 550 мг/л, от или от приблизительно 500 мг/л до или до приблизительно 600 мг/л, от или от приблизительно 500 мг/л до или до приблизительно 650 мг/л, от или от приблизительно 500 мг/л до или до приблизительно 750 мг/л, от или от приблизительно 550 мг/л до или до приблизительно 600 мг/л, от или от приблизительно 500 мг/л до или до приблизительно 650 мг/л, от или от приблизительно 500 мг/л до или до приблизительно 750 мг/л, от или от приблизительно 550 мг/л до или до приблизительно 600 мг/л, от или от приблизительно 550 мг/л до или до приблизительно 750 мг/л, от или от приблизительно 600 мг/л до или до приблизительно 650 мг/л, от или от приблизительно 600 мг/л до или до приблизительно 750 мг/л или от или от приблизительно 650 мг/л до или до приблизительно 750 мг/л. В некоторых вариантах осуществления концентрация трансферрина является такой, что после объединения добавки с базальной средой (такой как среды, описанные в настоящем описании) концентрация трансферрина в среде составляет или приблизительно составляет 100 мг/л. В некоторых вариантах осуществления концентрация трансферрина является такой, что после объединения добавки с базальной средой (такой как среды, описанные в настоящем описании) концентрация трансферрина в среде составляет от или от приблизительно 50 мг/л до или до приблизительно 150 мг/л.

[0087] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают инсулин или заменитель инсулина. В некоторых вариантах осуществления заменитель инсулина является цинксодержащим соединением, которое может использоваться вместо инсулина с получением по существу таких же результатов, как с инсулином. Примеры заменителей инсулина включают, без ограничения перечисленными, хлорид цинка, нитрат цинка, бромид цинка и сульфат цинка. Средним специалистам в данной области известно множество инсулинов. См. Gilman, A.G. et al, Eds., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Pergamon Press, New York, 1990, pp. 1463-1495. В некоторых вариантах осуществления инсулин, а не заменитель инсулина, используется в добавке и среде. В некоторых вариантах осуществления инсулин является инсулин цинком. В некоторых вариантах осуществления инсулин является человеческим инсулин цинком.

[0088] В некоторых вариантах осуществления инсулин является человеческим инсулином или получен из человеческого инсулина. В некоторых вариантах осуществления инсулин является рекомбинантным инсулином. В некотором варианте осуществления инсулин является рекомбинантным человеческим инсулином. В некотором варианте осуществления концентрация инсулина (или заменителя инсулина) является такой, что после объединения добавки с базальной средой (такой как среды, описанные в настоящем описании) концентрация инсулина (или заменителя инсулина) в среде

[illegible]

мг/л, от или от приблизительно 12,5 мг/л до или до приблизительно 15 мг/л, от или от приблизительно 12,5 мг/л до или до приблизительно 17,5 мг/л, от или от приблизительно 12,5 мг/л до или до приблизительно 20 мг/л, от или от приблизительно 12,5 мг/л до или до приблизительно 22,5 мг/л, от или от приблизительно 12,5 мг/л до или до приблизительно 25 мг/л, от или от приблизительно 12,5 мг/л до или до приблизительно 27,5 мг/л, от или от приблизительно 12,5 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л, от или от приблизительно 15 мг/л до или до приблизительно 17,5 мг/л, от или от приблизительно 15 мг/л до или до приблизительно 20 мг/л, от или от приблизительно 15 мг/л до или до приблизительно 22,5 мг/л, от или от приблизительно 15 мг/л до или до приблизительно 25 мг/л, от или от приблизительно 15 мг/л до или до приблизительно 27,5 мг/л, от или от приблизительно 15 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л, от или от приблизительно 17,5 мг/л до или до приблизительно 20 мг/л, от или от приблизительно 17,5 мг/л до или до приблизительно 22,5 мг/л, от или от приблизительно 17,5 мг/л до или до приблизительно 25 мг/л, от или от приблизительно 17,5 мг/л до или до приблизительно 27,5 мг/л, от или от приблизительно 17,5 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л, от или от приблизительно 20 мг/л до или до приблизительно 22,5 мг/л, от или от приблизительно 20 мг/л до или до приблизительно 25 мг/л, от или от приблизительно 20 мг/л до или до приблизительно 27,5 мг/л, от или от приблизительно 20 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л, от или от приблизительно 22,5 мг/л до или до приблизительно 25 мг/л, от или от приблизительно 22,5 мг/л до или до приблизительно 27,5 мг/л, от или от приблизительно 22,5 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л, от или от приблизительно 25 мг/л до или до приблизительно 27,5 мг/л или от или от приблизительно 27,5 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л. В некоторых вариантах осуществления концентрация инсулина или заменителя инсулина в среде составляет или приблизительно составляет 10 мг/л. В некоторых вариантах осуществления концентрация инсулина или заменителя инсулина в среде составляет от или от приблизительно 7,5 мг/л до или до приблизительно 12,5 мг/л.

[0089] В некоторых вариантах осуществления добавку, например первую добавку, приготавливают путем добавления или смешивания L-глутамин с существующими добавками, содержащими один или более требуемых компонентов. В некоторых вариантах осуществления L-глутамин добавляют в или смешивают с добавкой, заменяющей сыворотку, например, Immune Cell Serum Replacement (ThermoFisher, #A2598101). В некоторых вариантах осуществления L-глутамин добавляют в или смешивают с добавкой, включающей заменитель сыворотки для иммунных клеток, описанный в публикации Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамин в добавке составляет от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 30 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 50 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 70 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 90 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 110 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 130 мМ, от или от

приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или до приблизительно 170 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 50 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 70 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 90 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 110 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 130 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 30 мМ до или до приблизительно 170 мМ, от или от приблизительно 50 мМ до или до приблизительно 70 мМ, от или от приблизительно 50 мМ до или до приблизительно 90 мМ, от или от приблизительно 50 мМ до или до приблизительно 110 мМ, от или от приблизительно 50 мМ до или до приблизительно 130 мМ, от или от приблизительно 50 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 50 мМ до или до приблизительно 170 мМ, от или от приблизительно 70 мМ до или до приблизительно 90 мМ, от или от приблизительно 70 мМ до или до приблизительно 110 мМ, от или от приблизительно 70 мМ до или до приблизительно 130 мМ, от или от приблизительно 70 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 70 мМ до или до приблизительно 170 мМ, от или от приблизительно 90 мМ до или до приблизительно 110 мМ, от или от приблизительно 90 мМ до или до приблизительно 130 мМ, от или от приблизительно 90 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 90 мМ до или до приблизительно 170 мМ, от или от приблизительно 110 мМ до или до приблизительно 130 мМ, от или от приблизительно 110 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 110 мМ до или до приблизительно 170 мМ, от или от приблизительно 130 мМ до или до приблизительно 150 мМ, от или от приблизительно 130 мМ до или до приблизительно 170 мМ или от или от приблизительно 150 мМ до или до приблизительно 170 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамин в добавке составляет или приблизительно составляет 80 мМ.

[0090] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включает фактор роста. В некоторых вариантах осуществления фактор роста включает эпидермальный фактор роста (EGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста включает фактор роста фибробластов (FGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста включает инсулиноподобный фактор роста (IGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста включает фактор роста нервов (NGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста включает фактор роста тромбоцитов (PDGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста включает трансформирующий фактор роста (TGF).

[0091] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают гормон (например, гормон роста, инсулин, гидрокортизон, трийодтиронин, эстроген, андроген, прогестерон, пролактин, фолликулостимулирующий гормон, гастрин-релизинг пептид). В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают альфа-глобулин или бета-глобулин. В некоторых

вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают пептид или фракцию пептида (например, белковый гидролизат, полученный из животного, микроорганизма или растения).

[0092] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включает липид. В некоторых вариантах осуществления липид включает холестерин. В некоторых вариантах осуществления липид включает стероид. В некоторых вариантах осуществления липид включает жирную кислоту (например, пальмитат, стеарат, олеат, линолеат). В некоторых вариантах осуществления липид включает этаноламин. В некоторых вариантах осуществления липид включает холин. В некоторых вариантах осуществления липид включает инозит.

[0093] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают переходный металл. В некоторых вариантах осуществления переходный металл включает железо. В некоторых вариантах осуществления переходный металл включает цинк. В некоторых вариантах осуществления переходный металл включает медь. В некоторых вариантах осуществления переходный металл включает хром. В некоторых вариантах осуществления переходный металл включает иод. В некоторых вариантах осуществления переходный металл включает кобальт. В некоторых вариантах осуществления переходный металл включает селен. В некоторых вариантах осуществления переходный металл включает магний. В некоторых вариантах осуществления переходный металл включает молибден.

[0094] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают витамин. В некоторых вариантах осуществления витамин включает жирорастворимый витамин (например, витамин А, витамин D, витамин Е, витамин К). В некоторых вариантах осуществления витамин включает водорастворимый витамин (например, В1, В2, В6, В₁₂, С, фолат).

[0095] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают полиамин. В некоторых вариантах осуществления полиамин включает путресцин. В некоторых вариантах осуществления полиамин включает спермидин. В некоторых вариантах осуществления полиамин включает спермин.

[0096] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают восстановитель. В некоторых вариантах осуществления восстановитель включает 2-меркаптоэтанол. В некоторых вариантах осуществления восстановитель включает альфа-тиоглицерин. В некоторых вариантах осуществления восстановитель включает восстановленный глутатион.

[0097] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают защитную добавку. В некоторых вариантах осуществления защитная добавка включает карбоксиметилцеллюлозу. В некоторых вариантах осуществления защитная добавка включает поливинилпирролидон. В некоторых вариантах осуществления защитная добавка включает плуроник F-68. В некоторых вариантах осуществления защитная добавка включает Tween 80.

[0098] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают фактор адгезии. В некоторых вариантах осуществления фактор адгезии включает фибронектин. В некоторых вариантах осуществления фактор адгезии включает ламинин.

[0099] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов является одним или более из одного или более антиоксидантов, одного или более альбуминов или заменителей альбумина, одного или более липидных средств, одного или более инсулинов или заменителей инсулина, одного или более трансферринов или заменителей трансферрина, одного или более микроэлементов и одного или более глюкокортикоидов. В некоторых вариантах осуществления антиоксиданты включают N-ацетил-L-цистеин, 2-меркаптоэтанол или ацетат D, L-токоферола, или их производные или смеси. В некоторых вариантах осуществления альбумин является человеческим сывороточным альбумином. В некоторых вариантах осуществления липидные средства включают Human Ex-Cyte® или этаноламин, или их производные и смеси. В некоторых вариантах осуществления инсулин является человеческим инсулин цинком. В некоторых вариантах осуществления трансферрин является человеческим насыщенным железом трансферрином. В некоторых вариантах осуществления микроэлементом является Se^{4+} . В некоторых вариантах осуществления глюкокортикоид является гидрокортизоном. В некоторых вариантах осуществления добавка является концентрированной.

[0100] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включает один или более антиоксидантов и один или более компонентов, выбранных из группы, состоящей из одного или более альбуминов или заменителей альбумина, одного или более липидных средств, одного или более инсулинов или заменителей инсулина, одного или более трансферринов или заменителей трансферрина, одного или более микроэлементов и одного или более глюкокортикоидов.

[0101] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают одно или более из N-ацетил-L цистеина, человеческого сывороточного альбумина, Human Ex-Cyte®, этаноламина, человеческого инсулин цинка, человеческого насыщенного железом трансферрина, Se^{4+} , гидрокортизона, ацетат D, L-токоферола и/или 2-меркаптоэтанола.

[0102] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают N-ацетил-L-цистеин (NAC). В некоторых вариантах осуществления концентрация NAC является такой, что после объединения добавки с базальной средой (такой как среды, описанные в настоящем описании) концентрация NAC в базальной среде составляет от или от приблизительно 10 мг/л до или до приблизительно 50 мг/л, от или от приблизительно 10 мг/л до или до приблизительно 100 мг/л, от или от приблизительно 10 мг/л до или до приблизительно 150 мг/л, от или от приблизительно 10 мг/л до или до приблизительно 200 мг/л, от или от приблизительно 10 мг/л до или до приблизительно 250 мг/л, от или от приблизительно 10 мг/л до или до приблизительно 300 мг/л, от или от приблизительно 10 мг/л до или до приблизительно 350 мг/л, от или от

[illegible]

[0103] В некоторых вариантах осуществления концентрация NAC в базальной

[illegible]

[illegible]

[0104] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают этаноламин. В некоторых вариантах осуществления концентрация этаноламина является такой, что после объединения добавки с базальной средой (такой как среды, описанные в настоящем описании) концентрация этаноламина в базальной среде составляет от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 2 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 4 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 6 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 8 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 10 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 12 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 14 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 16 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 18 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 20 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 22 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 24 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 26 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 28 мг/л, от или от приблизительно 0 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л, от или от приблизительно 2 мг/л до или до приблизительно 4 мг/л, от или от приблизительно 2 мг/л до или до приблизительно 6 мг/л, от или от приблизительно 2 мг/л до или до приблизительно 8 мг/л, от или от приблизительно 2 мг/л до или до приблизительно 10 мг/л, от или от приблизительно 2 мг/л до или до приблизительно 12 мг/л, от или от приблизительно 2 мг/л до или до приблизительно 14 мг/л, от или от приблизительно 2 мг/л до или до приблизительно 16 мг/л, от или от приблизительно 2 мг/л до или до приблизительно 18 мг/л, от или от приблизительно 2 мг/л до или до приблизительно 20 мг/л, от или от приблизительно 2 мг/л до или до приблизительно 22 мг/л, от или от приблизительно 2 мг/л до или до приблизительно 24 мг/л, от или от

[illegible]

приблизительно 24 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л, от или от приблизительно 26 мг/л до или до приблизительно 28 мг/л, от или от приблизительно 26 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л или от или от приблизительно 28 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л.

[0105] В некоторых вариантах осуществления добавка является жидкостью. В некоторых вариантах осуществления добавку не замораживают или не рекомендуют замораживать для хранения. В некоторых вариантах осуществления добавка включает альбумин, N-ацетил-L-цистеин (NAC) и этаноламин. В некоторых вариантах осуществления добавка включает альбумин, N-ацетил-L-цистеин (NAC) и этаноламин, где концентрация альбумина, NAC и/или этаноламина является такой, что после объединения добавки с базальной средой (такой как среды, описанные в настоящем описании) концентрация альбумина, NAC и/или этаноламина является по существу такой же, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления альбумин является человеческим альбумином. В некоторых вариантах осуществления альбумин является человеческим альбумином из человеческой плазмы или сыворотки. В некоторых вариантах осуществления добавка является жидкостью и не содержит или не содержит существенного количества свободной формы глутамин (т.е. L-глутамин).

[0106] В некоторых вариантах осуществления другую добавку, например вторую добавку, объединяют с базальными средами для предоставления одного или более дополнительных компонентов. В некоторых вариантах осуществления другая добавка, например вторая добавка, является добавкой для экспансии клеток. В некоторых вариантах осуществления другая добавка, например вторая добавка, представляет собой или включает добавку OpTmizer® (Thermofisher, часть A1048503).

[0107] В некоторых вариантах осуществления добавка сконцентрирована от 2 или приблизительно 2 раз до или до приблизительно 100 раз. В некоторых вариантах осуществления добавка представляет собой или представляет собой приблизительно 40× состав. В некоторых вариантах осуществления на литр базальной среды добавляют 20-30 или приблизительно 20-30 миллилитров, например 25±2 миллилитра, по меньшей мере одной добавки, включая первую добавку и, в некоторых случаях, одну или более других добавок.

С. Бессывороточные среды

[0108] В некоторых вариантах осуществления бессывороточные среды включают синтетическую аминокислоту (например, дипептидную форму L-глутамин, например, L-аланил-L-глутамин), свободную форму глутамин (т.е. L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота (например, дипептидная форма L-глутамин, например, L-аланил-L-глутамин) может превращаться в свободную форму глутамин (т.е. L-глутамин) в клеточной культуре, включающей клетку, где среда является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления клетка включает клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка включает иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка является генетически

модифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является генетически модифицированной Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка генетически модифицирована для экспрессии рекомбинантного рецептора (например, химерного антигенного рецептора). В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR).

[0109] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда дополнительно включает по меньшей мере один белок. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда включает синтетическую аминокислоту, где синтетическая аминокислота (например, дипептидная форма L-глутамина, например, L-аланил-L-глутамин) может превращаться в свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин) в клеточной культуре, включающей клетку, свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин), и по меньшей мере один белок, где среда является бессывороточной.

[0110] В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота является стабилизированной формой глутамина (т.е. L-глутамина). В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота является более стабильной, чем глутамин (т.е. L-глутамин) в водном растворе (например, бессывороточной среде). В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество глутамина в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество глутамина (т.е. L-глутамина) в течение по меньшей мере или приблизительно 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 14 дней в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество глутамина (т.е. L-глутамина) в течение по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество глутамина (т.е. L-глутамина) в течение по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество глутамина (т.е. L-глутамина) в течение по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 лет в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере или приблизительно 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 14 дней в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере от или от приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по

меньшей мере от или от приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует существенное количество пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 лет в бессывороточной среде.

[0111] В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота растворима в водном растворе (например, бессывороточной среде). В некоторых вариантах осуществления растворимость синтетической аминокислоты в водном растворе выше, чем у свободной формы глутамин (т.е. L-глутамин).

[0112] В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота способна к транспорту в клетку, где она может превращаться в свободную форму глутамин (т.е. L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления клетка включает иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка является генетически модифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клеткой является генетически модифицированной Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка генетически модифицирована для экспрессии рекомбинантного рецептора (например, химерного антигенного рецептора). В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR).

[0113] В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота является дипептидом. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота является трипептидом. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота является дипептидной формой L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамином).

[0114] В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин) в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ-5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин) в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин) составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ-1 мМ, 0,5 мМ-1,5 мМ, 0,5 мМ-2 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-4 мМ, 0,5 мМ-4,5 мМ, 0,5 мМ-5 мМ, 1 мМ-1,5 мМ, 1 мМ-2 мМ, 1 мМ-2,5 мМ, 1 мМ-3 мМ, 1 мМ-3,5 мМ, 1 мМ-4 мМ, 1 мМ-4,5 мМ, 1 мМ-5 мМ, 1,5 мМ-2 мМ, 1,5 мМ-2,5 мМ, 1,5 мМ-3 мМ, 1,5 мМ-3,5 мМ, 1,5 мМ-4 мМ, 1,5 мМ-4,5 мМ, 1,5 мМ-5 мМ, 2 мМ-2,5 мМ, 2 мМ-3 мМ, 2 мМ-3,5 мМ, 2 мМ-4 мМ, 2 мМ-4,5 мМ, 2 мМ-5 мМ, 2,5 мМ-3 мМ, 2,5 мМ-3,5 мМ, 2,5 мМ-4 мМ, 2,5 мМ-4,5 мМ, 2,5 мМ-5 мМ, 3 мМ-3,5 мМ, 3 мМ-4 мМ, 3 мМ-4,5 мМ, 3 мМ-5 мМ, 3,5 мМ-4 мМ, 3,5 мМ-4,5 мМ, 3,5 мМ-5 мМ, 4 мМ-4,5 мМ, 4 мМ-5 мМ или 4,5 мМ-5 мМ, все включительно. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин) в бессывороточной среде составляет или

приблизительно составляет 5 мМ-7,5 мМ, 5 мМ-10 мМ, 5 мМ-12,5 мМ, 5 мМ-15 мМ, 5 мМ-17,5 мМ, 5 мМ-20 мМ, 7,5 мМ-10 мМ, 7,5 мМ-12,5 мМ, 7,5 мМ-15 мМ, 7,5 мМ-17,5 мМ, 7,5 мМ-20 мМ, 10 мМ-12,5 мМ, 10 мМ-15 мМ, 10 мМ-17,5 мМ, 10 мМ-20 мМ, 12,5 мМ-15 мМ, 12,5 мМ-17,5 мМ, 12,5 мМ-20 мМ, 15 мМ-17,5 мМ, 15 мМ-20 мМ или 17,5 мМ-20 мМ, все включительно. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в бессывороточной среде составляет по меньшей мере или приблизительно 0,5 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в бессывороточной среде составляет самое большее или приблизительно 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ, 5 мМ, 5,5 мМ, 6 мМ, 6,5 мМ, 7 мМ, 7,5 мМ, 8 мМ, 8,5 мМ, 9 мМ, 9,5 мМ, 10 мМ, 12,5 мМ, 15 мМ, 17,5 мМ или 20 мМ.

[0115] В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (т.е. L-глутамина) в бессывороточной среде составляет приблизительно 0,5 мМ-5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (т.е. L-глутамина) в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (т.е. L-глутамина) в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ-1 мМ, 0,5 мМ-1,5 мМ, 0,5 мМ-2 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-4 мМ, 0,5 мМ-4,5 мМ, 0,5 мМ-5 мМ, 1 мМ-1,5 мМ, 1 мМ-2 мМ, 1 мМ-2,5 мМ, 1 мМ-3 мМ, 1 мМ-3,5 мМ, 1 мМ-4 мМ, 1 мМ-4,5 мМ, 1 мМ-5 мМ, 1,5 мМ-2 мМ, 1,5 мМ-2,5 мМ, 1,5 мМ-3 мМ, 1,5 мМ-3,5 мМ, 1,5 мМ-4 мМ, 1,5 мМ-4,5 мМ, 1,5 мМ-5 мМ, 2 мМ-2,5 мМ, 2 мМ-3 мМ, 2 мМ-3,5 мМ, 2 мМ-4 мМ, 2 мМ-4,5 мМ, 2 мМ-5 мМ, 2,5 мМ-3 мМ, 2,5 мМ-3,5 мМ, 2,5 мМ-4 мМ, 2,5 мМ-4,5 мМ, 2,5 мМ-5 мМ, 3 мМ-3,5 мМ, 3 мМ-4 мМ, 3 мМ-4,5 мМ, 3 мМ-5 мМ, 3,5 мМ-4 мМ, 3,5 мМ-4,5 мМ, 3,5 мМ-5 мМ, 4 мМ-4,5 мМ, 4 мМ-5 мМ или 4,5 мМ-5 мМ, все включительно. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (т.е. L-глутамина) в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 5 мМ-7,5 мМ, 5 мМ-10 мМ, 5 мМ-12,5 мМ, 5 мМ-15 мМ, 5 мМ-17,5 мМ, 5 мМ-20 мМ, 7,5 мМ-10 мМ, 7,5 мМ-12,5 мМ, 7,5 мМ-15 мМ, 7,5 мМ-17,5 мМ, 7,5 мМ-20 мМ, 10 мМ-12,5 мМ, 10 мМ-15 мМ, 10 мМ-17,5 мМ, 10 мМ-20 мМ, 12,5 мМ-15 мМ, 12,5 мМ-17,5 мМ, 12,5 мМ-20 мМ, 15 мМ-17,5 мМ, 15 мМ-20 мМ или 17,5 мМ-20 мМ, все включительно. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (т.е. L-глутамина) в среде составляет по меньшей мере или приблизительно 0,5 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (т.е. L-глутамина) в бессывороточной среде составляет самое большее или приблизительно 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ, 5 мМ, 5,5 мМ, 6 мМ, 6,5 мМ, 7 мМ, 7,5 мМ, 8 мМ, 8,5 мМ, 9 мМ, 9,5 мМ, 10 мМ, 12,5 мМ, 15 мМ, 17,5 мМ или 20 мМ.

[0116] В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина, такой как L-аланил-L-глутамин, в бессывороточной среде составляет от или от приблизительно 0,5 мМ до или до приблизительно 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина, такой как L-аланил-L-глутамин, в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в бессывороточной среде составляет от или от приблизительно 0,5 мМ до или до приблизительно 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ.

[0117] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда включает по меньшей мере один белок. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок не является белком немлекопитающего происхождения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является человеческим или получен у человека. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных компонентов включают по меньшей мере один белок. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок не является белком немлекопитающего происхождения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является человеческим или получен у человека. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок включает альбумин, трансферрин, инсулин, фибронектин, апротинин или фетуин. В некоторых вариантах осуществления белок включает один или более из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно один или более из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

[0118] В некоторых вариантах осуществления бессывороточные среды включают альбумин. В некоторых вариантах осуществления альбумин получен у человека. В некоторых вариантах осуществления альбумин получен из человеческой сыворотки или человеческой плазмы. В некоторых вариантах осуществления альбумин является рекомбинантным белком. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный альбумин получен у человека. В некотором варианте осуществления рекомбинантный белок не получен у человека. В некоторых вариантах осуществления добавка включает природный альбумин. В некоторых вариантах осуществления природный альбумин получен у человека. В некоторых вариантах осуществления природный альбумин не получен у человека. В некоторых вариантах осуществления концентрации альбумина в бессывороточной среде составляет от или от приблизительно 0 мг/мл до или до приблизительно 2 мг/мл, от или от приблизительно 0 мг/мл до или до приблизительно 4 мг/мл, от или от приблизительно 0 мг/мл до или до приблизительно 6 мг/мл, от или от приблизительно 0 мг/мл до или до приблизительно 8 мг/мл, от или от приблизительно 0 мг/мл до или до приблизительно 10 мг/мл, от или от приблизительно 0 мг/мл до или до

[illegible]

[illegible]

[0120] В некоторых вариантах осуществления добавка включает инсулин или заменитель инсулина (такие как описанные в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления инсулин получен у человека. В некоторых вариантах осуществления инсулин является рекомбинантным инсулином. В некотором варианте осуществления инсулин является рекомбинантным человеческим инсулином. В некотором варианте осуществления концентрация инсулина (или заменителя инсулина) в бессывороточной среде составляет от или от приблизительно 1 мг/л до или до приблизительно 2,5 мг/л, от или от приблизительно 1 мг/л до или до приблизительно 5 мг/л, от или от приблизительно 1 мг/л до или до приблизительно 7,5 мг/л, от или от

приблизительно 12,5 мг/л до или до приблизительно 22,5 мг/л, от или от приблизительно 12,5 мг/л до или до приблизительно 25 мг/л, от или от приблизительно 12,5 мг/л до или до приблизительно 27,5 мг/л, от или от приблизительно 12,5 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л, от или от приблизительно 15 мг/л до или до приблизительно 17,5 мг/л, от или от приблизительно 15 мг/л до или до приблизительно 20 мг/л, от или от приблизительно 15 мг/л до или до приблизительно 22,5 мг/л, от или от приблизительно 15 мг/л до или до приблизительно 25 мг/л, от или от приблизительно 15 мг/л до или до приблизительно 27,5 мг/л, от или от приблизительно 15 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л, от или от приблизительно 17,5 мг/л до или до приблизительно 20 мг/л, от или от приблизительно 17,5 мг/л до или до приблизительно 22,5 мг/л, от или от приблизительно 17,5 мг/л до или до приблизительно 25 мг/л, от или от приблизительно 17,5 мг/л до или до приблизительно 27,5 мг/л, от или от приблизительно 17,5 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л, от или от приблизительно 20 мг/л до или до приблизительно 22,5 мг/л, от или от приблизительно 20 мг/л до или до приблизительно 25 мг/л, от или от приблизительно 20 мг/л до или до приблизительно 27,5 мг/л, от или от приблизительно 20 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л, от или от приблизительно 22,5 мг/л до или до приблизительно 25 мг/л, от или от приблизительно 22,5 мг/л до или до приблизительно 27,5 мг/л, от или от приблизительно 22,5 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л, от или от приблизительно 27,5 мг/л или от или от приблизительно 27,5 мг/л до или до приблизительно 30 мг/л. В некоторых вариантах осуществления концентрация инсулина или заменителя инсулина в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 10 мг/л. В некоторых вариантах осуществления концентрация инсулина или заменителя инсулина в бессывороточной среде составляет от или от приблизительно 7,5 мг/л до или до приблизительно 12,5 мг/л.

[0121] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда не содержит феноловый красный. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит феноловый красный.

[0122] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда включает питательную смесь неорганических солей, сахаров, аминокислот, необязательно также содержащих витамины, органические кислоты, антиоксиданты, липиды, факторы роста, N-ацетилцистеин, этаноламин и/или буферы. Примеры включают описанные в настоящем описании, например, в разделе выше, включая неорганические соли, сахара, аминокислоты, витамины, органические кислоты, антиоксиданты, липиды, факторы роста, N-ацетилцистеин, этаноламин и/или буферы.

[0123] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда включает один или более компонентов, выбранных из одного или более из одного или более антиоксидантов, одного или более альбуминов или заменителей альбумина, одного или более липидных средств, одного или более инсулинов или заменителей инсулина, одного или более трансферринов или заменителей трансферрина, одного или более микроэлементов, одного или более глюкокортикоидов, одной или более неорганических

солей, одного или более источников энергии, одного или более буферных веществ, одной или более пируватных солей, одного или более индикаторов pH, одной или более аминокислот и одного или более витаминов. В некоторых вариантах осуществления антиоксиданты выбраны из группы, состоящей из N-ацетил-L-цистеина, 2-меркаптоэтанола и ацетата D, L-токоферола, или их производных или смесей. В некоторых вариантах осуществления альбумин является человеческим сывороточным альбумином. В некоторых вариантах осуществления липидными средствами являются Human Ex-Cyte® и этаноламин. В некоторых вариантах осуществления инсулин является человеческим инсулином с цинком. В некоторых вариантах осуществления трансферрин является человеческим насыщенным железом трансферрином. В некоторых вариантах осуществления глюкокортикоид является гидрокортизоном. В некоторых вариантах осуществления компонент неорганической соли включает одну или более неорганических солей, выбранных из группы, состоящей из одной или более солей кальция, одной или более солей калия, одной или более солей магния, одной или более солей натрия, одной или более карбонатных солей и одной или более фосфатных солей. В некоторых вариантах осуществления источником энергии является D-глюкоза. В некоторых вариантах осуществления буферным веществом является HEPES. В некоторых вариантах осуществления пируватная соль является пируватом натрия. В некоторых вариантах осуществления индикатор pH является феноловым красным. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный компонент включает одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из глицина, L-аланина, L-аспарагина, L-цистеина, L-аспарагиновой кислоты, L-глутаминовой кислоты, L-фенилаланина, L-гистидина, L-изолейцина, L-лизина, L-лейцина, L-глутамин, L-аргинин HCl, L-метионина, L-пролина, L-гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина и L-валина, а также их солей и производных. В некоторых вариантах осуществления компонент витамина включает один или более витаминов, выбранных из группы, состоящей из биотина, D-пантотената кальция, холина хлорида, фолиевой кислоты, i-инозита, ниацинамида, пиридоксаль HCl, рибофлавина, тиамин HCl и витамина B12 и их производных. В некоторых вариантах осуществления компоненты включают N-ацетил-L-цистеин, человеческий сывороточный альбумин, 2-меркаптоэтанол, D, L-токоферола ацетат, Human Ex-Cyte®, этаноламин, человеческий инсулин с цинком, насыщенный железом трансферрин, Se^{4+} , гидрокортизон, Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , D-глюкозу, HEPES, пируват натрия, феноловый красный, глицин, L-аланин, L-аспарагин, L-цистеин, L-аспарагиновую кислоту, L-глутаминовую кислоту, L-фенилаланин, L-гистидин, L-изолейцин, L-лизин, L-лейцин, L-глутамин, L-аргинин HCl, L-метионин, L-пролин, L-гидроксипролин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, L-тирозин и L-валин, биотин, кальция D-пантотенат, холина хлорид, фолиевую кислоту, i-инозит, ниацинамид, пиридоксаль HCl, рибофлавин, тиамин HCl и витамин B2.

[0124] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к бессывороточной среде, включающей базальную среду и по меньшей мере одну добавку.

Различные примеры базальной среды и добавок описаны в настоящем описании, например, в разделе выше.

[0125] В некоторых вариантах осуществления состав бессывороточной среды включает от или от приблизительно 90% до или до приблизительно 97,5% (об/об) базальной среды, от или от приблизительно 2,5% до или до приблизительно 10% (об/об) добавки, например, первой добавки и/или второй добавки. В некоторых вариантах осуществления состав бессывороточной среды включает от или от приблизительно 90% до или до приблизительно 97,5% (об/об) базальной среды, от или от приблизительно 1,25% до или до приблизительно 5% (об/об) первой добавки и от или от приблизительно 1,25% до или до приблизительно 5% (об/об) второй добавки.

[0126] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к бессывороточной среде, включающей базальную среду, первую добавку и вторую добавку. В некоторых вариантах осуществления базальная среда включает жидкость, включающую синтетическую аминокислоту (например, дипептидную форму L-глутамина, например, L-аланил-L-глутамин), и где базальная среда не содержит или по существу не содержит свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин) и/или белок. В некоторых вариантах осуществления первая добавка включает свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин), где первую добавку замораживают или хранят при температуре ниже комнатной температуры (например, ниже или ниже чем приблизительно 20, 10, 15, 5, 0, -5, -10, -15 или -20°C) в течение большей части времени после того, как глутамин становится ее компонентом, и до предполагаемого применения (например, применения в качестве добавки для базальной среды). В некоторых вариантах осуществления первая добавка включает свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин), где первую добавку замораживают или хранят при температуре ниже комнатной температуры (например, ниже или ниже чем приблизительно 20, 10, 15, 5, 0, -5, -10, -15 или -20°C) перед непосредственным объединением со средой (например, базальной средой). В некоторых вариантах осуществления вторая добавка включает альбумин, N-ацетил-L-цистеин (NAC) и/или этаноламин. В некоторых вариантах осуществления вторая добавка включает один или более компонентов, выбранных из группы, состоящей из одного или более антиоксидантов, одного или более альбуминов или заменителей альбумина, одного или более липидных средств, одного или более инсулинов или заменителей инсулина, одного или более трансферринов или заменителей трансферрина, одного или более микроэлементов и одного или более глюкокортикоидов.

[0127] В некоторых вариантах осуществления бессывороточные среды включают один или более цитокинов. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов являются рекомбинантными цитокинами. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов являются человеческими рекомбинантными цитокинами. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов связываются и/или способны к связыванию с рецепторами, которые экспрессируются Т-клетками и/или являются эндогенными для Т-клеток. В конкретных вариантах

осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают члена семейства цитокинов с пучком из 4 альфа-спиралей. В некоторых вариантах осуществления члены семейства цитокинов с пучком из 4 альфа-спиралей включают, без ограничения перечисленными, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ). В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают IL-15. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой или включают IL-7. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный IL-2. В некоторых вариантах осуществления цитокин включает IL-2. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокина выбран из IL-2, IL-7 или IL-15.

[0128] В некоторых вариантах осуществления концентрация цитокина составляет от или от приблизительно 1 МЕ/мл до или до приблизительно 2000 МЕ/мл, от или от приблизительно 10 МЕ/мл до или до приблизительно 100 МЕ/мл, от или от приблизительно 50 МЕ/мл до или до приблизительно 500 МЕ/мл, от или от приблизительно 100 МЕ/мл до или до приблизительно 200 МЕ/мл, от или от приблизительно 500 МЕ/мл до или до приблизительно 1400 МЕ/мл, от или от приблизительно 250 МЕ/мл до или до приблизительно 500 МЕ/мл или от или от приблизительно 500 МЕ/мл до или до приблизительно 2500 МЕ/мл.

[0129] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда включает IL-2. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 (например, человеческого рекомбинантного IL-2) составляет от или от приблизительно 2 МЕ/мл до или до приблизительно 500 МЕ/мл, от или от приблизительно 10 МЕ/мл до или до приблизительно 250 МЕ/мл, от или от приблизительно 100 МЕ/мл до или до приблизительно 500 МЕ/мл, от или от приблизительно 100 МЕ/мл до или до приблизительно 400 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления концентрация IL-2 составляет или приблизительно составляет 50 МЕ/мл, 75 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 125 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 175 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 225 МЕ/мл, 250 МЕ/мл, 300 МЕ/мл или 400 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 составляет или приблизительно составляет 200 МЕ/мл.

[0130] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда включает IL-7. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-7, например, человеческого рекомбинантного IL-7, составляет от или от приблизительно 10 МЕ/мл до или до приблизительно 5000 МЕ/мл, от или от приблизительно 500 МЕ/мл до или до приблизительно 2000 МЕ/мл, от или от приблизительно 600 МЕ/мл до или до приблизительно 1500 МЕ/мл, от или от приблизительно 500 МЕ/мл до или до приблизительно 2500 МЕ/мл, от или от приблизительно 750 МЕ/мл до или до приблизительно 1500 МЕ/мл или от или от приблизительно 1000 МЕ/мл до или до

приблизительно 2000 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления концентрация IL-7 составляет или приблизительно составляет 100 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 300 МЕ/мл, 400 МЕ/мл, 500 МЕ/мл, 600 МЕ/мл, 700 МЕ/мл, 800 МЕ/мл, 900 МЕ/мл, 1000 МЕ/мл, 1200 МЕ/мл, 1400 МЕ/мл или 1600 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-7 составляет приблизительно 1200 МЕ/мл.

[0131] В некоторых вариантах осуществления бессывороточные среды включают IL-15. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-15, например, человеческого рекомбинантного IL-15, составляет от или от приблизительно 0,1 МЕ/мл до или до приблизительно 200 МЕ/мл, от или от приблизительно 1 МЕ/мл до или до приблизительно 50 МЕ/мл, от или от приблизительно 5 МЕ/мл до или до приблизительно 25 МЕ/мл, от или от приблизительно 25 МЕ/мл до или до приблизительно 50 МЕ/мл, от или от приблизительно 5 МЕ/мл до или до приблизительно 15 МЕ/мл или от или от приблизительно 10 МЕ/мл до или до приблизительно 50 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления концентрация IL-15 составляет или приблизительно составляет 1 МЕ/мл, 2 МЕ/мл, 3 МЕ/мл, 4 МЕ/мл, 5 МЕ/мл, 6 МЕ/мл, 7 МЕ/мл, 8 МЕ/мл, 9 МЕ/мл, 10 МЕ/мл, 11 МЕ/мл, 12 МЕ/мл, 13 МЕ/мл, 14 МЕ/мл, 15 МЕ/мл, 20 МЕ/мл, 25 МЕ/мл, 30 МЕ/мл, 40 МЕ/мл, 50 МЕ/мл, 100 МЕ/мл или 200 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления концентрация IL-15 составляет приблизительно 20 МЕ/мл.

[0132] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда представляет собой концентрированный состав среды. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда не является концентрированным составом среды. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда сконцентрирована от или от приблизительно $2\times$ до или до приблизительно $100\times$. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда представляет собой $10\times$ или приблизительно $10\times$ состав. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда может храниться при температуре от или от приблизительно 2°C до 8°C .

[0133] В некоторых вариантах осуществления среда позволяет культивировать клетки в течение по меньшей мере 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней или более без дополнительного добавления L-глутамин, дипептидной формы глутамин или другой формы глутамин.

[0134] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда способна обеспечивать экспансию клеток в течение по меньшей мере 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней или более без дополнительного добавления L-глутамин, дипептидной формы глутамин или другой формы глутамин.

[0135] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда поддерживает или способствует экспансии клетки. В некоторых вариантах осуществления среда поддерживает или способствует жизнеспособности клетки. В некоторых вариантах осуществления среда поддерживает или способствует активации клетки.

[0136] В некоторых вариантах осуществления клетка включает иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка включает первичную иммунную клетку. В

некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка включает генетически модифицированную клетку. В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка включает Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка включает CD4 и/или CD8 Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления CD4 и/или CD8 Т-клетка является генетически модифицированной Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка генетически модифицирована для экспрессии рекомбинантного рецептора (например, химерного антигенного рецептора). В некоторых вариантах осуществления Т-клетка включает Т-клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR).

[0137] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда поддерживает или способствует жизнеспособности, экспансии и/или активации клеток, где клетки, культивируемые с бессывороточными средами, достигают сопоставимого функционального свойства (например, жизнеспособность, экспансию и продукцию цитокина или цитокинов), как клетки, культивируемые со средами, содержащими сыворотку, такими как среды, содержащие приблизительно 5-10% (об/об) человеческой сыворотки.

D. Способы получения бессывороточных сред

[0138] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу получения состава бессывороточной среды, включающему комбинацию: (a) базальной среды, включающей синтетическую аминокислоту, способную к превращению в свободную форму глутамин (например, L-глутамин) в клеточной культуре; (b) первой добавки, включающей свободную форму глутамин (т.е. L-глутамин), где первая добавка была заморожена в течение по меньшей мере части времени после того, как L-глутамин становится ее компонентом, и до объединения. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота является дипептидной формой L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамином). В некоторых вариантах осуществления базальная среда является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления базальная среда является жидким составом и/или не была заморожена до объединения и/или ее не рекомендуют замораживать в коммерческом протоколе, когда она находится на хранении. В некоторых вариантах осуществления первая добавка была заморожена в течение большей части времени после того, как L-глутамин стал ее компонентом, и до объединения с базальной средой. В некоторых вариантах осуществления первая добавка была заморожена и разморожена до объединения.

[0139] В некоторых вариантах осуществления первую добавку размораживают в качестве жидкого состава не больше чем от или от приблизительно одной недели, такой как не больше чем от или от приблизительно 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дня, обычно не больше чем от или от приблизительно 12 часов, 6 часов, 2 часа, 1 час или 30 минут, до объединения с базальной средой. В некоторых вариантах осуществления первую добавку, содержащую L-глутамин, хранят замороженной недолго (например, 6, 12, 16, 24, 36, 48 часов) или непосредственно до объединения. В некоторых вариантах осуществления первая добавка,

содержащая L-глутамин, была жидким составом в течение меньше чем от или от приблизительно 48, 24, 16, 12, 8, 4 или 2 часов до объединения с базальной средой. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота является дипептидом L-глутамина. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота является L-аланил-L-глутамином.

[0140] В некоторых вариантах осуществления состав бессывороточной среды включает от или от приблизительно 90% до 98,75% (об/об) базальной среды и от или от приблизительно 1,25% до 10% (об/об) первой добавки. В некоторых вариантах осуществления состав бессывороточной среды включает от или от приблизительно 90% до 97,5% (об/об) базальной среды и от или от приблизительно 1,25% до 5% (об/об) первой добавки. В некоторых вариантах осуществления состав бессывороточной среды включает от или от приблизительно 95% (об/об) базальной среды и от или от приблизительно 2,5% $\pm$ 0,2% (об/об) первой добавки, например, 2,5% (об/об) или приблизительно 2,5% (об/об). В некоторых вариантах осуществления на литр базальной среды добавляют 25 или приблизительно 25 миллилитров первой добавки.

[0141] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает объединение второй добавки. В некоторых вариантах осуществления вторая добавка включает один или более дополнительных компонентов, таких как любой из описанных выше, включая один или более антиоксидантов, один или более альбуминов или заменителей альбумина, одно или более липидных средств, один или более инсулинов или заменителей инсулина, один или более трансферринов или заменителей трансферрина, один или более микроэлементов и один или более глюкокортикоидов. Примеры компонентов второй добавки описаны выше.

[0142] В некоторых вариантах осуществления вторая добавка включает альбумин, N-ацетилцистеин (NAC) и этаноламин. В некоторых вариантах осуществления вторая добавка включает альбумин, N-ацетилцистеин (NAC) и этаноламин, где концентрация альбумина, NAC и/или этаноламина является такой, что после объединения второй добавки с базальной средой (такой как среды, описанные в настоящем описании) концентрация альбумина, NAC и/или этаноламина является по существу такой же, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления альбумин является человечески альбумином. В некоторых вариантах осуществления альбумин является человеческим альбумином из человеческой плазмы или сыворотки. В некоторых вариантах осуществления вторая добавка является жидкостью и не включает или не включает существенное количество свободной формы глутамина (т.е. L-глутамина).

[0143] В некоторых вариантах осуществления вторая добавка включает добавку OpTmizer® (ThermoFisher, часть A1048503).

[0144] В некоторых вариантах осуществления вторая добавка является жидкостью. В некоторых вариантах осуществления вторую добавку не замораживают или не рекомендуют замораживать для хранения. В некоторых вариантах осуществления состав бессывороточной среды включает от или от приблизительно 1,25% до или до

приблизительно 5% (об/об) второй добавки, например, 2,5% $\pm$ 0,2% или приблизительно 2,5% $\pm$ 0,2%, например, 2,5% или приблизительно 2,5% или 2,6% или приблизительно 2,6%. В некоторых вариантах осуществления на литр базальной среды добавляют приблизительно 26 миллилитров второй добавки.

[0145] В некоторых вариантах осуществления состав бессывороточной среды включает от или от приблизительно 90% до или до приблизительно 97,5% (об/об) базальной среды, от или от приблизительно 1,25% до или до приблизительно 5% (об/об) первой добавки и от или от приблизительно 1,25% до или до приблизительно 5% (об/об) второй добавки. В некоторых вариантах осуществления состав бессывороточной среды включает 95% или приблизительно 95% (об/об) базальной среды, 2,5% $\pm$ 0,2% или приблизительно 2,5% $\pm$ 0,2% (об/об) первой добавки и 2,5% $\pm$ 0,2% или приблизительно 2,5% $\pm$ 0,2% (об/об) второй добавки.

II. Способы получения и приготовления композиции клеток

[0146] В некоторых вариантах осуществления бессывороточные среды по изобретению могут использоваться в способах культивирования клеток, например, в отношении одного или более из активации, трансдукции, экспансии, культивирования или пролиферации клеток, включая иммунные клетки, такие как Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления способы культивирования клеток в присутствии бессывороточной среды по изобретению могут проводить в качестве части процесса создания или получения генетически модифицированных клеток, таких как генетически модифицированные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в течение по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней с предложенной бессывороточной средой. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в течение приблизительно 2-3 дней, 3-4 дней, 4-5 дней, 5-6 дней, 6-7 дней, 7-8 дней, 8-9 дней, 9-10 дней, 10-11 дней, 11-12 дней, 12-13 дней, 13-14 дней, 14-15 дней, 15-16 дней, 16-17 дней, 17-18 дней, 18-19 дней или 19-20 дней, все включительно. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют приблизительно при 37°C. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в атмосфере 5% CO₂/95% воздуха. В некоторых вариантах осуществления культивирование могут проводить в течение больше чем или больше чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней без замены среды при культивировании клеток. В некоторых вариантах осуществления при культивировании клеток могут использовать методы перфузии, такие как полунепрерывную перфузию.

[0147] В некоторых вариантах осуществления клетки являются первичными клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки являются иммунными клетками или обогащенными иммунными клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки являются Т-клетками или обогащенными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки являются CD4+ Т-клетками или обогащенными CD4+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки являются CD8+ Т-клетками или обогащенными CD8+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки

включают генетически модифицированные клетки или обогащенную популяцию генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки включают клетки, подлежащие генетической модификации, или генетически модифицированные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки включают обогащенную популяцию клеток, подлежащих генетической модификации, или генетически модифицированные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки включают генетически модифицированные Т-клетки или обогащенную популяцию генетически модифицированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки включают Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), или обогащенные CAR-экспрессирующие Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки были ранее криоконсервированы. В некоторых вариантах осуществления клетку культивировали в бессывороточной среде и криоконсервировали после культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетки специфично воздействуют на опухолевую клетку.

[0148] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам культивирования клеток, например, для культивирования, экспансии или пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления способы проводят для по меньшей мере или приблизительно 1,5-кратной, 2-кратной, 3-кратной, 4-кратной, 5-кратной, 6-кратной, 7-кратной, 8-кратной, 9-кратной, 10-кратной, 15-кратной, 20-кратной, 25-кратной, 30-кратной, 35-кратной, 40-кратной, 45-кратной, 50-кратной, 55-кратной, 60-кратной, 65-кратной, 70-кратной, 75-кратной, 80-кратной, 85-кратной, 90-кратной, 95-кратной, 100-кратной или больше экспансии клеток, например, после культивирования в присутствии бессывороточной среды, необязательно с одним или более другими цитокинами или реагентами, в течение или в течение приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней. В некоторых вариантах осуществления клетки размножаются по меньшей мере приблизительно в 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз или 50 или больше раз после культивирования в составе бессывороточной среды в течение приблизительно 5-6 дней. В некоторых вариантах осуществления экспансия сопоставима или улучшена по сравнению с культивированием со средой, содержащей сыворотку, при таких же условиях, например, после культивирования в течение или в течение приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше дней.

[0149] В некоторых вариантах осуществления в отношении способов культивирования по изобретению, например, в отношении активации, трансдукции, культивирования, экспансии или пролиферации клеток, бессывороточные среды дополнительно содержат один или более цитокинов, и/или культивирование производят в присутствии одного или более цитокинов. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов выбраны из IL-2, IL-7 и IL-15. В некоторых вариантах осуществления клетки являются Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки являются CD4⁺ Т-клетками и/или CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах

осуществления клетки являются генетически модифицированными Т-клетками.

[0150] В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению используются в отношении одной или более стадий или процессов, задействованных в получении, создании или производстве клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия включает клетки, такие как Т-клетки, модифицированные рекомбинантным рецептором, таким как химерный антигенный рецептор, например, CAR Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления одна или более стадий включают выделение, разделение, отбор, активацию или стимуляцию, трансдукцию, культивирование, экспансию, промывку, суспендирование, разбавление, концентрирование и/или изготовление составов клеток. В некоторых вариантах осуществления способы создания или получения клеточной терапии включают выделение клеток у субъекта, получение, обработку, культивирование при одном из стимулирующих условий. В некоторых вариантах осуществления способ включает стадии обработки, выполняемые в порядке, в котором: клетки, например первичные клетки, сначала выделяют, например, отбирают или отделяют, из биологического образца; отобранные клетки инкубируют с вирусными векторными частицами для трансдукции, необязательно после стадии стимуляции выделенных клеток в присутствии стимулирующего реагента; культивируют трансдуцированные клетки, например, для экспансии клеток; включают трансдуцированные клетки в состав композиции и инкубируют композицию в сосуде для биомедицинских материалов. В некоторых вариантах осуществления полученные модифицированные клетки повторно вводят тому же субъекту, до или после криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления любая одна или более из вышеуказанных стадий могут быть осуществлены в присутствии бессывороточной среды.

[0151] В некоторых вариантах осуществления одна или более стадий обработки могут включать одно или более из: (а) промывки биологического образца, содержащего клетки (например, образца цельной крови, образца лейкотромбоцитарного слоя, образца моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), образца нефракционированных Т-клеток, образца лимфоцитов, образца лейкоцитов, продукта афереза или продукта лейкофереза), (b) выделения, например отбора, из образца требуемой субпопуляции или популяции клеток (например, CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток), например, при инкубировании клеток с реагентом для отбора или иммуноафинным реагентом для иммуноафинного разделения; с) введения средства, кодирующего рекомбинантный рецептор, например CAR, в выделенные или отобранные клетки, например, путем инкубации выделенных, например, отобранных клеток с вирусными векторными частицами, кодирующими рекомбинантный рецептор, (d) культивирования или экспансии клеток, например, при использовании способов, как описано, и (е) включения трансдуцированных клеток, например, в фармацевтически приемлемый буфер, криоконсервант или другую подходящую среду. В некоторых вариантах осуществления способы могут дополнительно включать: (f) стимуляцию клеток путем воздействия на клетки стимулирующих условий, что могут проводить до, во время и/или после инкубации клеток с вирусными векторными

частицами. В некоторых вариантах осуществления одна или более дополнительных стадий промывки или суспендирования, например, для разбавления, концентрирования и/или замены буфера клеток, также могут быть осуществлены до или после любой из вышеуказанных стадий. В некоторых аспектах полученную композицию модифицированных клеток вводят в один или более биомедицинских сосудов для культивирования. В некоторых вариантах осуществления любая одна или больше вышеуказанных стадий могут быть осуществлены в присутствии бессывороточной среды.

[0152] В некоторых вариантах осуществления процесс производства, создания или получения клеточной терапии включает стадию, на которой суммарные Т-клетки, например, CD3⁺ или CD4⁺/CD8⁺ Т-клетки, выделяют или отбирают перед выполнением следующих стадий процесса.

[0153] В некоторых вариантах осуществления процесс производства, создания или получения клеточной терапии включает стадию, на которой CD4⁺ и CD8⁺ клетки отдельно выделяют и затем смешивают вместе перед этапом введения рекомбинантного рецептора, например CAR, в клетки. В некоторых вариантах осуществления CD4⁺ и CD8⁺ клетки смешивают в отношении от или от приблизительно 1:5 до или до приблизительно 5:1 CD4⁺ к CD8⁺ Т-клеткам, таком как от или от приблизительно 1:3 до или до приблизительно 3:1, от или от приблизительно 1:2 до или до приблизительно 2:1 или в отношении 1:1 или приблизительно 1:1 CD4⁺ к CD8⁺ клеткам, перед введением средства, кодирующего рекомбинантный рецептор и/или одним или более последующими стадиями обработки для получения генетически модифицированных клеток.

[0154] В некоторых вариантах осуществления процесс производства, создания или получения клеточной терапии включает стадию отдельного выделения CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и отдельное выполнение одной или более следующих стадий с отобранными или выделенными CD4⁺ Т-клетками и отдельное выполнение одной или более следующих стадий с отобранными или выделенными CD8⁺ Т-клетками. В аспектах такого варианта осуществления, трансдуцированные клетки, такие как отдельные композиции CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток, генетически модифицированных рекомбинантным рецептором, например CAR, могут быть объединены вместе в виде одной композиции до стадии получения состава клеток. В других аспектах такого варианта осуществления, трансдуцированные клетки, такие как трансдуцированные клетки, такие как отдельные композиции CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток, генетически модифицированных рекомбинантным рецептором, например CAR, включают в отдельные составы, например, для отдельного введения субъекту.

[0155] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу по изобретению получения или производства генетически модифицированных клеток проводят таким образом, что одну, больше или все стадии при получении клеток для клинического применения, например, в адоптивной клеточной терапии, проводят, не подвергая клетки нестерильным условиям и без необходимости в использовании стерильной комнаты или кабинета. В некоторых вариантах осуществления такого

процесса клетки выделяют, отделяют или отбирают, трансдуцируют, промывают, необязательно активируют или стимулируют и включают в состав, все в закрытой системе. В некоторых аспектах такого процесса клетки получают из закрытой системы и вводят в один или больше сосудов для биоматериала. В некоторых вариантах осуществления способы выполняют автоматизированно. В некоторых вариантах осуществления один или более стадий выполняют вне закрытой системы или устройства.

[0156] В некоторых вариантах осуществления закрытая система используется для выполнения одной или более других стадий обработки в способе производства, создания или получения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления выделение или разделение производят при использовании системы, устройства или аппарата, которые выполняют одно или более из стадий выделения, получения клеток, разделения, обработки, инкубации, культивирования и/или составления способов по изобретению. В некоторых аспектах система используется для выполнения каждой из этих стадий в закрытой или стерильной среде, например, для сведения к минимуму ошибки, вмешательства пользователя и/или контаминации. В некоторых вариантах осуществления одну или более или все стадии обработки, например, выделение, отбор и/или обогащение, обработку, инкубацию в отношении стадий трансдукции и модификации, и составления проводят с использованием системы, устройства или аппарата в интегрированной или отдельной системе, и/или автоматизированным или программируемым способом. В некоторых аспектах система или устройство включают компьютер и/или компьютерную программу в связи с системой или устройством, которая позволяет пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или регулировать различные аспекты стадий обработки, выделения, модификации и изготовления составов. В одном примере система является системой, описанной в публикации Международной заявки на патент WO2009/072003 или US 20110003380 A1. В некоторых вариантах осуществления система или устройство включают центрифужную камеру, например, для выполнения одного или более стадий обработки клеток. В одном примере система является системой, описанной в Международной публикации WO2016/073602.

A. Выделение или отбор клеток из образцов

[0157] В некоторых вариантах осуществления стадии обработки включают выделение клеток или их композиций из биологических образцов, таких как образцы, полученные у субъекта или происходящие от субъекта, такого как субъект, имеющий конкретное заболевание или состояние или нуждающийся в клеточной терапии, или которому будут вводить клеточную терапию. В некоторых аспектах субъектом является человек, такой как субъект, который является пациентом, нуждающимся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, обрабатывают и/или модифицируют. Таким образом, клетки в некоторых вариантах осуществления являются первичными клетками, например, первичными клетками человека. В некоторых вариантах осуществления клетки включают CD4+ и CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки включают CD4+

или CD8+ Т-клетки.

[0158] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, такие как нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантный белок, являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, таком как образец, полученный из другого организма или клетки, который, например, обычно не присутствует в подвергаемой модификации клетке и/или организме, из которого такая клетка получена. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты не являются природными, такими как нуклеиновая кислота, не существующая в природе, в том числе нуклеиновая кислота, включающая химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих разные домены из множества клеток разных типов.

[0159] Клетки обычно являются эукариотическими клетками, такими как клетки млекопитающих, и, как правило, являются клетками человека. В некоторых вариантах осуществления клетки получены из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, являются клетками иммунной системы, такими как клетки врожденного или приобретенного иммунитета, например, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, обычно Т-клетки и/или НК-клетки. Другие примерные клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, в том числе индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК). Клетки, как правило, являются первичными клетками, такими как клетки, выделенные непосредственно у субъекта и/или выделенные у субъекта и замороженные. В некоторых вариантах осуществления клетки включают одну или более субпопуляций Т-клеток или других типов клеток, таких как целые популяции Т-клеток, CD4+ клеток, CD8+ клеток и их субпопуляции, такие как определенные функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом к дифференцировке, экспансией, рециркуляцией, локализацией и/или способностью к персистенции, антигенной специфичностью, типом рецептора антигена, присутствием в конкретном органе или компартменте, маркерами или профилем секреции цитокинов и/или степенью дифференцировки. В отношении субъекта, подлежащего лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. Способы включают стандартные способы. В некоторых аспектах, например, для стандартных технологий, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, такими как стволовые клетки, такие как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК). В некоторых вариантах осуществления способы включают выделение клеток у субъекта, получение, обработку, культивирование и/или их модификацию и их повторное введение тому же субъекту, до или после криоконсервации.

[0160] Подтипы и субпопуляции Т-клеток и/или CD4+ и/или CD8+ Т-клеток включают наивные Т (T_N) клетки, эффекторные Т-клетки (TEFF), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}), Т-клетки центральной памяти (T_{CM}), эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}) или терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки,

ассоциированные со слизистой оболочкой инвариантные Т клетки (MAIT), природные и адаптивные регуляторные Т (Treg) клетки, Т-хелперы, такие как TH1 клетки, TH2 клетки, TH3 клетки, TH17 клетки, TH9 клетки, TH22 клетки, фолликулярные Т-хелперы, альфы/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

[0161] В некоторых вариантах осуществления клетки являются естественными киллерными клетками (NK). В некоторых вариантах осуществления клетки являются моноцитами или гранулоцитами, например, миелоидными клетками, макрофагами, нейтрофилами, дендритными клетками, тучными клетками, эозинофилами и/или базофилами.

[0162] В некоторых вариантах осуществления клетки включают одну или более нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантный ген или генетически модифицированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, таком как образец, полученный из другого организма или клетки, который, например, обычно не присутствуют в модифицированной клетке и/или организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты не являются природными, такими как нуклеиновая кислота, не существующая в природе, включая нуклеиновую кислоту, включающую химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих разные домены из множества клеток разных типов.

[0163] В некоторых вариантах осуществления получение модифицированных клеток включает одну или более стадий культивирования и/или получения, некоторые или все из которых проводят в присутствии бессывороточной среды, предложенной в настоящем описании. Клетки для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансгенный рецептор, такой как CAR, могут быть выделены из образца, такого как биологический образец, например, образец, полученный или происходящий от субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект, у которого выделена клетка, является субъектом, имеющим заболевание или состояние, или нуждающимся в клеточной терапии или которому будут вводить клеточную терапию.

[0164] Образцы включают ткань, жидкость и другие образцы, взятые непосредственно у субъекта, а также образцы, полученные в результате одной или более стадий обработки, таких как разделение, центрифугирование, генная инженерия (например, трансдукция вирусным вектором), промывка и/или инкубация. Биологический образец может быть образцом, полученным непосредственно из биологического источника или образца, который подвергают обработке. Биологические образцы включают, без ограничения перечисленными, физиологические жидкости, такие как кровь, плазму, сыворотку, спинномозговую жидкость, синовиальную жидкость, мочу и пот, образцы ткани и органов, в том числе обработанные образцы, полученные из них.

[0165] В некоторых аспектах образец является кровью или полученным из крови

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

[0166] В некоторых примерах клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, путем афереза или лейкофереза. Образцы в некоторых аспектах содержат лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядродержащие лейкоциты, эритроциты и/или тромбоциты, и, в некоторых аспектах, содержат другие клетки, отличные от эритроцитов и тромбоцитов.

[0167] В некоторых вариантах осуществления клетки крови, забранные у субъекта, промывают, например, для удаления плазменной фракции и помещения клеток в подходящий буфер или среды для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления раствор для промывки не содержит кальция и/или магния, и/или многих или никаких двухвалентных катионов. В некоторых аспектах этап промывки выполняют при использовании полуавтоматической "проточной" центрифуги (например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter) согласно инструкциям производителя. В некоторых аспектах этап промывки выполняют путем фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) согласно инструкциям производителя. В некоторых вариантах осуществления клетки ресуспендируют в различных биосовместимых буферах после промывки, такой как, например, не содержащим $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ PBS. В некоторых вариантах осуществления компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в среде для культивирования.

[0168] В некоторых вариантах осуществления способы получения включают стадии замораживания, например криоконсервации, клеток, до или после выделения, отбора и/или обогащения, и/или инкубации для трансдукции и модификации. В некоторых вариантах осуществления при замораживании и последующем этапе размораживания удаляют гранулоциты и, в некоторой степени, моноциты в популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для замораживания, например, после стадии промывки, для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах может использоваться любой из различных известных растворов для замораживания и параметров. Затем раствор разбавляют 1:1 средой, чтобы конечная концентрация ДМСО и ЧСА составляла 10% и 4%, соответственно. После этого клетки обычно замораживают при температуре -80°C со скоростью 1° в минуту и хранят в

паровой фазе в емкости для хранения в жидком азоте.

[0169] В некоторых вариантах осуществления выделение клеток или популяций включает одну или более стадий получения и/или неаффинного разделения клеток. В некоторых примерах клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или более реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения требуемыми компонентами, лизиса или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах клетки разделяют на основе одного или более свойств, таких как плотность, адгерентные свойства, размер, чувствительность и/или устойчивость к конкретным компонентам. В некоторых вариантах осуществления способы включают способы разделения клеток по плотности, такие как получение лейкоцитов из периферической крови путем лизиса эритроцитов и центрифугирования в градиенте плотности перколла или фиколла.

[0170] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть стадии отбора включает инкубацию клеток с реагентом для отбора. Инкубация с реагентом или реагентами для отбора, например, как часть методов отбора, которые могут быть выполнены при использовании одного или более реагентов для отбора с целью отбора клеток одного или более разных типов по экспрессии или присутствию в или на клетке одной или более специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления любой известный метод может использоваться при использовании реагента или реагентов для отбора с целью разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления реагент или реагенты для отбора приводят к разделению, которое является аффинным или иммуноаффинным разделением. Например, отбор в некоторых аспектах включает инкубацию с реагентом или реагентами для разделения клеток и популяций клеток по экспрессии клеток или уровня экспрессии одного или более маркеров, как правило, маркеров клеточной поверхности, например, при инкубации с антителом или партнером по связыванию, которые специфично связываются с такими маркерами, обычно с последующими стадиями промывки и отделения клеток, связавшихся с антителом или партнером по связыванию, от тех клеток, которые не связались с антителом или партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления отбор и/или другие аспекты процесса являются такими, как описано в публикации Международной заявки на патент WO/2015/164675.

[0171] В некоторых аспектах таких процессов объем клеток смешивают с количеством требуемого реагента для аффинного отбора. Иммуноаффинный отбор могут проводить при помощи любой системы или способа, которые приводят к благоприятному энергетическому взаимодействию между разделяемыми клетками и молекулой, специфично связывающейся с маркером на клетке, например, антителом или другим партнером по связыванию, на твердой поверхности, например, частице. В некоторых вариантах осуществления способы проводят при использовании частиц, таких как сферы, например, магнитные сферы, которые покрыты средством для отбора (например,

антителом), специфичным к маркеру клеток. Частицы (например, сферы) могут инкубировать или смешивать с клетками в контейнере, таком как пробирка или мешок, при встряхивании или перемешивании, при постоянном отношении плотности клеток к частице (например, сфере), чтобы способствовать возникновению энергетически выгодных взаимодействий. В других случаях способы включают отбор клеток, в которых весь отбор или часть отбора проводят во внутренней полости центрифужной камеры, например, при вращении ротора центрифуги. В некоторых вариантах осуществления инкубирование клеток с реагентами для отбора, такими как реагенты для иммуноаффинного отбора, проводят в центрифужной камере. В некоторых вариантах осуществления выделение или разделение производят при использовании системы или устройства, описанного в публикации Международной заявки на патент WO2009/072003 или US 20110003380 A1. В одном примере система представляет собой систему, описанную в Международной публикации WO2016/073602.

[0172] В некоторых вариантах осуществления, при проведении таких стадий отбора или их частей (например, инкубации с покрытыми антителами частицами, например, магнитными сферами) в полости центрифужной камеры, пользователь может контролировать некоторые параметры, такие как объем различных растворов, добавление раствора во время обработки и подбор их времени, что может обеспечить преимущества по сравнению с другими доступными способами. Например, возможность уменьшить объем жидкости в полости в ходе инкубации может увеличивать концентрацию частиц (например, реагента в виде сфер), используемых при отборе, и, таким образом, повысить химический потенциал раствора, не влияя на общее количество клеток в полости. Это, в свою очередь, может улучшить парные взаимодействия между обрабатываемыми ячейками и частицами, используемыми для отбора. В некоторых вариантах осуществления проведение стадии инкубации в камере, например, когда он связан с системами, схемами и контролем, как описано в настоящем описании, позволяет пользователю осуществлять перемешивание раствора в нужный момент(ы) во время инкубации, что также может улучшить взаимодействие.

[0173] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть стадии отбора проводят в центрифужной камере, что включает инкубацию клеток с реагентом для отбора. В некоторых аспектах таких процессов объем клеток смешивают с количеством требуемого реагента для аффинного отбора, которое намного меньше, чем обычно используемое при выполнении подобных отборов, в пробирке или контейнере, для отбора такого же количества клеток и/или объема клеток, согласно инструкциям производителя. В некоторых вариантах осуществления используется количество реагента или реагентов для отбора, которое составляет не больше 5%, не больше 10%, не больше 15%, не больше 20%, не больше 25%, не больше 50%, не больше 60%, не больше 70% или не больше 80% количества такого же реагента(ов) для отбора, используемого для отбора, при инкубировании в пробирке или контейнере, такого же количества клеток и/или такого же объема клеток согласно инструкциям производителя.

[0174] В некоторых вариантах осуществления для отбора, например, иммуноаффинного отбора клеток, клетки инкубируют в полости камеры в композиции, также содержащей буфер для отбора, с реагентом для отбора, таким как молекула, которая специфично связывается с поверхностным маркером на клетке, которую нужно обогатить и/или истощить, но не на других клетках в композиции, такая как антитело, которое необязательно связано с каркасом, таким как полимер, или поверхностью, например, сферой, например, магнитной сферой, такой как магнитные сферы, связанные с моноклональными антителами, специфичными к CD4 и CD8. В некоторых вариантах осуществления, как описано, реагент для отбора добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое существенно меньше (например, составляет не больше 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% от количества) по сравнению с количеством реагента для отбора, который, как правило, используется или будет необходим для достижения примерной такой же или подобной эффективности отбора такого же количества клеток или такого же объема клеток, когда отбор производят в пробирке с встряхиванием или вращением. В некоторых вариантах осуществления инкубирование производят с добавлением буфера для отбора к клеткам и реагенту для отбора с получением целевого объема с инкубированием реагента, например, от 10 мл до 200 мл, например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 150 мл или 200 мл. В некоторых вариантах осуществления буфер для отбора и реагент для отбора предварительно смешивают перед добавлением к клеткам. В некоторых вариантах осуществления буфер для отбора и реагент для отбора отдельно добавляют к клеткам. В некоторых вариантах осуществления инкубирование при отборе проводят в условиях периодического мягкого перемешивания, которое может способствовать возникновению энергетически выгодных взаимодействий и, таким образом, позволит использовать в целом меньше реагента для отбора с сохранением высокой эффективности отбора.

[0175] В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность инкубации с реагентом для отбора реагентом для отбора от или от приблизительно 5 минут до или до приблизительно 6 часов, например, от 30 минут до 3 часов, например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 30 минут, 60 минут, 120 минут или 180 минут.

[0176] В некоторых вариантах осуществления инкубирование обычно проводят в условиях смешивания, например, в присутствии вращения, обычно при относительно низкой силе или скорости, такой как скорость ниже, чем используемая для осаждения клеток, такой как от или от приблизительно 600 об/мин до или до приблизительно 1700 об/мин (например, составляющая или составляющая приблизительно или по меньшей мере 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин, или 1700 об/мин), такой как при RCF в образце или на стенке камеры или другом контейнере от или от приблизительно 80 g до 100 g (например, составляющей или составляющей приблизительно или по меньшей мере 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах осуществления вращение

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

[0177] В некоторых вариантах осуществления такой процесс проводят в полностью закрытой системе, с которой камера представляет единое целое. В некоторых вариантах осуществления этот процесс (и в некоторых аспектах также один или более дополнительных стадий, таких как предыдущий этап промывки, в котором промывают содержащий клетки образец, такой как образец афереза) проводят в автоматическом режиме, при этом клетки, реагент и другие компоненты подают камеру и выпускают из камеры в подходящее время, и проводят центрифугирование с завершением стадии промывки и связывания в одной закрытой системе с использованием автоматизированной программы.

[0178] В некоторых вариантах осуществления, после инкубации и/или смешивания клеток и реагента и/или реагентов для отбора, инкубируемые клетки подвергают разделению для отбора клеток по присутствию или отсутствию конкретного реагента или реагентов. В некоторых вариантах осуществления разделение проводят в одной и той же закрытой системе, в которой проводили инкубирование клеток с реагентом для отбора. В некоторых вариантах осуществления, после инкубации с реагентами для отбора, инкубируемые клетки, включая клетки, в которых связался реагент для отбора, переносят в систему для иммуноафинного разделения клеток. В некоторых вариантах осуществления система для иммуноафинного разделения представляет собой или содержит магнитную разделительную колонку.

[0179] В некоторых вариантах осуществления методы выделения включают разделение различных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или более определенных молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления может использоваться любой известный метод разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления разделение является афинным или иммуноафинным разделением. Например, выделение в некоторых аспектах включает отделение клеток и популяций клеток на основе экспрессии клеток или уровня экспрессии одного или более маркеров, как правило, маркеров клеточной поверхности, например, при инкубировании с антителом или партнером по связыванию, который специфично связывается с такими маркерами, обычно с последующими стадиями промывки и разделения клеток, связавшихся с антителом или партнером по связыванию, от тех клеток, которые не связались с антителом или партнером по связыванию.

[0180] Такие стадии разделения могут быть основаны на положительном отборе, в котором клетки, связавшиеся с реагентами, например, антителом или партнером по связыванию, сохраняют для последующего применения, и/или на отрицательном отборе, в котором сохраняют клетки, не связывавшиеся с реагентом, например, антителом или

партнером по связыванию. В некоторых примерах обе фракции сохраняют для последующего применения. В некоторых аспектах отрицательный отбор может быть особенно полезным, если не доступно никакое антитело, который позволяет специфично идентифицировать тип клетки в гетерогенной популяции, при этом разделение лучше всего проводить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от нужной популяции.

[0181] В некоторых вариантах осуществления стадии процесса дополнительно включают отрицательный и/или положительный отбор инкубируемых клеток, например, при использовании системы или устройства, которые позволяют производить отбор на основе аффинности. В некоторых вариантах осуществления выделение проводят посредством обогащения конкретной популяции клеток путем положительного отбора или истощения конкретной популяции клеток путем отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления положительный или отрицательный отбор выполняют путем инкубации клеток с одним или более антителами или другим связывающим средством, которое специфично связывается с одним или более поверхностными маркерами, экспрессируемыми или экспрессируемыми (маркер+) на относительно более высоком уровне (маркер^{высокий}) на положительно или отрицательно отобранных клетках, соответственно.

[0182] Разделение не должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной клетки или популяции клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительный отбор клеток или обогащение клетками конкретного типа, такими как клетки, которые экспрессируют маркер, относится к увеличению количества или процентного содержания таких клеток, но не должен приводить к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих такой маркер. Аналогичным образом, отрицательный отбор, удаление или истощение клеток конкретного типа, таких как клетки, которые экспрессируют маркер, относится к уменьшению количества или процентного содержания таких клеток, но не должно приводить к полному удалению всех таких клеток.

[0183] В некоторых примерах выполняют множество повторов стадий разделения, где положительно или отрицательно отобранную фракцию из одной стадии подвергают другой стадии разделения, такой как последующий положительный или отрицательный отбор. В некоторых примерах одна стадия разделения может элиминировать клетки, экспрессирующие множество маркеров, одновременно, например, при инкубировании клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, каждый из которых специфичен к маркеру, являющимся мишенью для отрицательного отбора. Аналогичным образом, множество типов клеток могут одновременно подвергаться положительному отбору при инкубировании клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессируемых на клетках различных типов.

[0184] Например, в некоторых аспектах определенные субпопуляции Т-клеток, таких как клетки, положительные на или экспрессирующие высокий уровень одного или

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

[0185] В конкретных вариантах осуществления биологический образец, например, образец МКПК или других лейкоцитов, подвергаются отбору $CD4^+$ Т-клеток, где сохраняют и отрицательную, и положительную фракции. В некоторых вариантах осуществления $CD8^+$ Т-клетки отбирают из отрицательной фракции. В некоторых вариантах осуществления биологический образец подвергают отбору $CD8^+$ Т-клеток, где сохраняют и отрицательную, и положительную фракции. В некоторых вариантах осуществления $CD4^+$ Т-клетки отбирают из отрицательной фракции.

[0186] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из образца МКПК при отрицательном отборе на маркеры, экспрессируемые на не-Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие лейкоциты, такие как $CD14$. В некоторых аспектах этап $CD4^+$ или $CD8^+$ отбора используют для отделения $CD4^+$ хелперных и $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток. Такие $CD4^+$ и $CD8^+$ популяции затем могут быть подвергнуты сортировке на субпопуляции путем положительного или отрицательного отбора на маркеры, экспрессируемые или экспрессируемые в относительно более высокой степени в одной или более субпопуляциях наивных, памяти и/или эффекторных Т-клетках.

[0187] В некоторых вариантах осуществления $CD8^+$ клетки дополнительно обогащают или истощают по наивным стволовым клеткам, центральной памяти, эффекторной памяти и/или стволовым клеткам центральной памяти, например, путем положительного или отрицательного отбора по поверхностным антигенам, ассоциированным с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления обогащение Т-клетками центральной памяти (T_{CM}) проводят для повышения эффективности, например, улучшения долговременной выживаемости, экспансии и/или приживания после введения, которые в некоторых аспектах являются особенно эффективными в таких субпопуляциях. См. Terakura et al., (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В некоторых вариантах осуществления объединение T_{CM} -обогащенных $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

[0188] В вариантах осуществления Т-клетки памяти присутствуют в $CD62L^+$ и в $CD62L^-$ субпопуляциях $CD8^+$ лимфоцитов периферической крови. МКПК могут быть

обогащены или обеднены CD62L-CD8⁺ и/или CD62L⁺CD8⁺ фракциями, например, при использовании антител против CD8 и против CD62L.

[0189] В некоторых вариантах осуществления обогащение Т-клетками центральной памяти (TCM) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; в некоторых аспектах оно основано на отрицательном отборе клеток, экспрессирующих или экспрессирующих высокие уровни CD45RA и/или гранзима В. В некоторых аспектах выделение CD8⁺ популяции, обогащенной ТCM-клетками, выполняют путем элиминирования клеток, экспрессирующих CD4, CD14, CD45RA, и путем положительного отбора или обогащения клетками, экспрессирующими CD62L. В одном аспекте обогащение Т-клетками центральной памяти (TCM) выполняют, начиная с отрицательной фракции клеток, отобранных по экспрессии CD4, которые подвергают отрицательному отбору по экспрессии CD14 и CD45RA, и положительному отбору по CD62L. Такие отборы в некоторых аспектах выполняют одновременно, а в других аспектах выполняют последовательно, в любом порядке. В некоторых аспектах такой же этап отбора, основанный на экспрессии CD4, используемый при получении CD8⁺ популяции или субпопуляции клеток, также используют для получения популяции или субпопуляции CD4⁺ клеток, при этом положительные и отрицательные фракции после разделения по CD4 сохраняют и используют в последующих стадиях способов, необязательно после одного или более дополнительных стадий положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления отбор популяции CD4⁺ клеток и отбор популяции CD8⁺ клеток производят одновременно. В некоторых вариантах осуществления отбор популяции CD4⁺ клеток и популяции CD8⁺ клеток выполняют последовательно, в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления способы отбора клеток могут включать способы, описанные в опубликованной заявке US20170037369. В некоторых вариантах осуществления отобранную популяцию CD4⁺ клеток и отобранную популяцию CD8⁺ клеток могут объединять после отбора. В некоторых аспектах отобранную популяцию CD4⁺ клеток и отобранную популяцию CD8⁺ клеток могут объединять в контейнере, таком как пакет.

[0190] В конкретном примере образец МКПК или образец других лейкоцитов подвергают отбору CD4⁺ клеток, где сохраняют отрицательные и положительные фракции. Затем отрицательную фракцию подвергают отрицательному отбору по экспрессии CD14 и CD45RA или CD19, и положительному отбору по маркерной характеристике Т-клеток центральной памяти, таких как CD62L или CCR7, где положительный и отрицательный отбор выполняют в любом порядке.

[0191] CD4⁺ Т-хелперные клетки могут сортировать с разделением наивных, центральной памяти и эффекторных клеток путем идентификации популяций клеток, которые имеют антигены клеточной поверхности. CD4⁺ лимфоциты могут быть получены стандартными способами. В некоторых вариантах осуществления наивные CD4⁺ Т-лимфоциты являются CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺ Т-клетками. В некоторых

вариантах осуществления $CD4^+$ клетки центральной памяти являются $CD62L^+$ и $CD45RO^+$. В некоторых вариантах осуществления эффекторные $CD4^+$ клетки являются $CD62L^-$ и $CD45RO^-$.

[0192] В одном примере для обогащения $CD4^+$ клетками путем отрицательного отбора смесь моноклональных антител, как правило, включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления антитело или партнер по связыванию связаны с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитная сфера или парамагнитная сфера, что позволяет выполнять разделение клеток путем положительного и/или отрицательного отбора. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки и популяции клеток разделяют или выделяют при использовании иммуномагнитных (или магнитоаффинных) методов разделения (рассмотренных в *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior In Vitro and In Vivo*, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

[0193] В некоторых аспектах инкубируемый образец или композиция клеток, подлежащие разделению, инкубируют с реагентом для отбора, содержащим мелкий, намагничиваемый или магниточувствительный материал, такой как магниточувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные сферы (например, такие как сферы Dynabeads или MACS®). Магниточувствительный материал, например частица, обычно напрямую или ненапрямую присоединен к партнеру по связыванию, например антителу, которое специфично связывается с молекулой, например поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые нужно разделить, например, которые нужно подвергнуть отрицательному или положительному отбору.

[0194] В некоторых вариантах осуществления магнитная частица или сфера включает магниточувствительный материал, связанный с определенным участником пары связывания, таким как антитело или другой партнер по связыванию. Существует множество магниточувствительных материалов, применяемых в способах магнитного разделения. Подходящие магнитные частицы включают магнитные частицы, описанные в патенте США 4,452,773 (Molday) и в описании европейской заявки EP 452342 B, которые настоящим включены путем ссылки. Другими примерами являются частицы коллоидных размеров, такие как описанные в патенте США 4,795,698 (Owen) и патенте США 5,200,084 (Liberti et al.)

[0195] Инкубацию обычно проводят в условиях, при которых антитела или партнеры по связыванию, или такие молекулы, как вторичные антитела или другие реагенты, специфично связывающиеся с такими антителами или партнерами по связыванию, которые связаны с магнитной частицей или сферой, специфично связываются с молекулами клеточной поверхности в случае их присутствия на клетках в образце.

[0196] В некоторых вариантах осуществления магниточувствительные частицы

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

[0197] В некоторых аспектах разделение достигается в процедуре, в которой образец помещают в магнитное поле, и клетки, к которым присоединены магниточувствительные или намагничиваемые частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от немеченых клеток. Для положительного отбора сохраняют клетки, которые притягиваются к магниту; для отрицательного отбора сохраняют клетки, которые не притягиваются (немеченые клетки). В некоторых аспектах комбинацию положительного и отрицательного отбора применяют во время одной стадии отбора, где положительные и отрицательные фракции сохраняют и затем обрабатывают или подвергают последующим стадиям разделения.

[0198] В некоторых вариантах осуществления отбор на основе аффинности осуществляется посредством магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Магнитно-активированная сортировка клеток (MACS), например, с использованием систем CliniMACS, позволяет с высокой чистотой производить отбор клеток, к которым прикреплены намагниченные частицы. В некоторых вариантах осуществления MACS работает в режиме, в котором нецелевые и целевые единицы последовательно элюируются после приложения внешнего магнитного поля. Таким образом, клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, тогда как неприкрепленные единицы элюируются. Затем, после завершения этой первой стадии элюирования, единицы, которые были задержаны в магнитном поле и не могли элюироваться, высвобождаются некоторым образом, что они могут быть элюированы и собраны. В некоторых вариантах осуществления нецелевые клетки метят и удаляют из гетерогенной популяции клеток.

[0199] В некоторых вариантах осуществления магниточувствительные частицы остаются прикрепленными к клеткам, которые затем подлежат инкубированию, культивированию и/или модификации; в некоторых аспектах частицы остаются прикрепленными к клеткам для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления намагничиваемые или магниточувствительные частицы удаляют с клеток. Способы удаления намагничиваемых частиц с клеток известны и включают, например, применение конкурирующих немеченых антител, намагничиваемых частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами, и т.д. В некоторых вариантах

осуществления намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

[0200] В некоторых аспектах разделение и/или другие стадии выполняют с помощью системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматизированного разделения клеток в клиническом масштабе в закрытой и стерильной системе. Компоненты могут включать интегрированный микрокомпьютер, блок магнитного разделения, перистальтический насос и различные пережимные клапаны. Интегрированный компьютер в некоторых аспектах управляет всеми компонентами прибора и направляет систему для выполнения повторных процедур в стандартизированной последовательности. Блок магнитного разделения в некоторых аспектах включает подвижный постоянный магнит и держатель для колонки отбора. Перистальтический насос регулирует скорость потока в системе трубок и, вместе с пережимными клапанами, создает регулируемый поток буфера через систему и постоянную суспензию клеток.

[0201] В системе CliniMACS в некоторых аспектах используются связанные с антителом намагничиваемые частицы, которые поставляют в стерильном апиrogenном растворе. В некоторых вариантах осуществления после мечения клеток магнитными частицами клетки промывают для удаления избытка частиц. Пакет с суспензией клеток затем подсоединяют к системе трубок, которая в свою очередь соединена с пакетом, содержащим буфер, и пакетом для сбора клеток. Система трубок состоит из предварительно собранных трубок, включающих предварительную колонку и разделительную колонку, и предназначена только для одноразового использования. После начала программы разделения система автоматически наносит образец клеток на разделительную колонку. Меченые клетки удерживаются внутри колонки, тогда как немеченые клетки удаляются в серии стадий промывки. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток для применения в способах, описанных в настоящем описании, не помечены и не удерживаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток для применения в способах, описанных в настоящем описании, помечены и удерживаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток для применения в способах, описанных в настоящем описании, элюируют с колонки после удаления магнитного поля и собирают в пакет для сбора клеток.

[0202] В некоторых вариантах осуществления разделение и/или другие стадии выполняют с помощью системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy в некоторых аспектах оборудована блоком обработки клеток, который производит автоматизированную промывку и фракционирование клеток с помощью центрифугирования. Система CliniMACS Prodigy также может включать в себя встроенную камеру и программу для распознавания изображения, которая определяет оптимальный результат фракционирования клеток путем различения макроскопических слоев исходного продукта клеток. Например, периферическая кровь автоматически разделяется на слои эритроцитов, лейкоцитов и плазмы. Система CliniMACS Prodigy также может включать в себя встроенную камеру для культивирования клеток, которая

выполняет протоколы культивирования клеток, такие как, например, дифференцировку и экспансию клеток, антигенную нагрузку и длительное культивирование клеток. Впускные порты могут обеспечивать стерильное удаление и восполнение сред, при этом клетки можно наблюдать с помощью встроенного микроскопа. См., например, Klebanoff et al. (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) *Blood*.1:72-82, and Wang et al. (2012) *J Immunother.*35(9):689-701.

[0203] В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, описанную в настоящем описании, собирают и обогащают (или обедняют) с помощью проточной цитометрии, в которой клетки, окрашенные на множество маркеров клеточной поверхности, переносятся в жидкостном потоке. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, описанную в настоящем описании, собирают и обогащают (или обедняют) с помощью (FACS)-сортировки в препаративном масштабе. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, описанную в настоящем описании, собирают и обогащают (или обедняют) при использовании чипов на основе микроэлектромеханических систем (МЭМС) в сочетании с системой обнаружения на основе FACS (см., например, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; и Godin et al. (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376). В обоих случаях клетки могут быть помечены множеством маркеров, что позволит выделять точно определенные субпопуляции Т-клеток с высокой чистотой.

[0204] В некоторых вариантах осуществления антитела или партнеры по связыванию помечены одним или более поддающимися обнаружению маркерами для облегчения разделения для положительного и/или отрицательного отбора. Например, разделение может быть основано на связывании с мечеными флуоресцентной меткой антителами. В некоторых примерах разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров по связыванию, специфичных к одному или нескольким маркерам клеточной поверхности, выполняют в жидкостном потоке, например, с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), включая препаративный масштаб (FACS) и/или чипы на основе микроэлектромеханических систем (МЭМС), например, в сочетании с проточно-цитометрической системой обнаружения. Такие способы позволяют одновременно производить положительный и отрицательный отбор на основе множества маркеров.

В. Активация и стимуляция клеток

[0205] В некоторых вариантах осуществления один или более стадий обработки включают стадию стимуляции выделенных клеток, таких как отобранные популяции клеток. Инкубация может быть осуществлена до или в комбинации с генетической модификацией, такой как генетическая модификация, следующая из вариантов осуществления способа трансдукции, описанного выше. В некоторых вариантах осуществления стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток, например, до трансдукции.

[0206] В некоторых вариантах осуществления стадии обработки включают

инкубацию клеток, таких как отобранные клетки, где стадии инкубации могут включать культуру, культивирование, стимуляцию, активацию и/или размножение клеток. Инкубация и/или модификация могут быть выполнены в культуральном сосуде, таком как блок, камера, лунка, колонка, пробирка, трубка, набор трубок, клапан, флакон, чашка для культивирования, мешок или другой контейнер для культуры или культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего средства. Такие условия включают условия, подобранные, чтобы обеспечить пролиферацию, активацию и/или выживание клеток в популяции, имитировать контакт с антигеном и/или примировать клетки для генетической модификации, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора.

[0207] В некоторых вариантах осуществления условия стимуляции и/или активации могут включать одну или более конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание углекислого газа, время, вещества, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие вещества, разработанные для активации клеток.

[0208] В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия или средства включают одно или более средств, например, лиганд, который способен вызывать активацию внутриклеточного сигнального домена комплекса TCR. В некоторых аспектах средство активирует или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке, например, средства, подходящие для передачи первичного сигнала, например, для инициации активации ИТАМ-индуцированного сигнала, такие как средства, специфичные к компоненту TCR, например, против CD3, и/или средство, которое вызывает костимулирующий сигнал, специфичный для Т-клеточного костимулирующего рецептора, например, против CD28 или против 41-BB, например, связанное с твердой подложкой, такой как сфера, и/или один или более цитокинов. Стимулирующие средства включают сферы против CD3/против CD28 (например, сферы DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander и/или ExpACT®). Необязательно способ экспансии может дополнительно включать этап добавления антитела против CD3 и/или против CD28 в среду культивирования. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие средства включают IL-2 и/или IL-15, например, концентрацию IL-2 по меньшей мере приблизительно 10 единиц/мл, по меньшей мере приблизительно 50 единиц/мл, по меньшей мере приблизительно 100 единиц/мл или по меньшей мере приблизительно 200 единиц/мл.

[0209] Условия могут включать одну или более конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание углекислого газа, время, вещества, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие вещества, разработанные

для активации клеток.

[0210] В некоторых аспектах инкубирование проводят в соответствии с методами, такими как описанные в патенте США 6,040,177 (Riddell et al.), Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9):651-660, Terakura et al. (2012) Blood 1:72-82, и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

[0211] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки размножают путем добавления к композиции, иницирующей культуру, питающих клеток, таких как неделящиеся моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) (например, так, что получаемая популяция клеток содержит по меньшей мере приблизительно 5, 10, 20 или 40 или больше МКПК питающих клеток на каждый Т-лимфоцит в исходной популяции, которую нужно размножить); и инкубации культуры (например, в течение времени, достаточного для увеличения количества Т-клеток). В некоторых аспектах неделящиеся питающие клетки могут включать гамма-облученные МКПК питающие клетки. В некоторых вариантах осуществления МКПК облучают гамма-излучением в диапазоне приблизительно 3000-3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах питающие клетки добавляют в среду перед добавлением популяций Т-клеток.

[0212] В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста человеческих Т-лимфоцитов, например, по меньшей мере приблизительно 25 градусов Цельсия, обычно по меньшей мере приблизительно 30 градусов, и обычно 37 или приблизительно 37 градусов Цельсия. Необязательно инкубирование может дополнительно включать добавление неделящихся ЭБВ-трансформированных лимфобластных клеток (LCL) в качестве питающих клеток. LCL могут быть облучены гамма-излучением в диапазоне приблизительно 6000-10000 рад. Питающие клетки LCL в некоторых аспектах обеспечивают в любом подходящем количестве, таком как при отношении питающих клеток LCL к исходным Т-лимфоцитам по меньшей мере приблизительно 10:1.

[0213] В вариантах осуществления антигенспецифичные Т-клетки, такие как антигенспецифичные CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки, получают путем стимуляции наивных или антигенспецифичных Т-лимфоцитов антигеном. Например, линии антигенспецифичных Т-клеток или клоны могут быть получены к антигенам цитомегаловируса при выделении Т-клеток у инфицированных субъектов и стимуляции клеток *in vitro* тем же антигеном.

[0214] 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 ротора центрифуги, как описано в Международной публикации WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации, проводимая в центрифужной камере, включает смешивание с реагентом или реагентами, чтобы вызвать стимуляцию и/или активацию. В некоторых вариантах осуществления клетки, такие как отобранные клетки, смешивают при стимулирующем условии или со стимулирующим

средством в центрифужной камере. В некоторых аспектах таких процессов объем клеток смешивают с некоторым количеством одного или более стимулирующих условий или средств, которое намного меньше, чем обычно используемое при проведении подобных стимуляций в планшете для культуры клеток или другой системе.

[0215] В некоторых вариантах осуществления стимулирующее средство добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое существенно меньше (например, составляет не больше 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% от количества) по сравнению с количеством стимулирующего средства, которое обычно используется или необходимо для достижения примерно такой же или подобной эффективности отбора из такого же количества клеток или такого же объема клеток, когда отбор проводят без смешивания в центрифужной камере, например, в пробирке или мешке при периодическом встряхивании или вращении. В некоторых вариантах осуществления инкубирование проводят при добавлении буфера для инкубации к клеткам и стимулирующему средству до получения требуемого объема, с инкубированием реагента в объеме, например, от 10 мл до 200 мл, например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 150 мл или 200 мл. В некоторых вариантах осуществления буфер для инкубации и стимулирующее средство предварительно смешивают перед добавлением к клеткам. В некоторых вариантах осуществления буфер для инкубации и стимулирующее средство добавляют к клеткам отдельно. В некоторых вариантах осуществления стимулирующее инкубирование проводят в условиях периодического мягкого перемешивания, которое может способствовать возникновению энергетически выгодных взаимодействий и, таким образом, позволить использовать в целом меньше стимулирующего средства при достижении стимуляции и активации клеток.

[0216] В некоторых вариантах осуществления инкубацию обычно проводят в условиях смешивания, например, в присутствии вращения, обычно при относительно низкой силе или скорости, например, скорости ниже, чем используемая для осаждения клеток, такой как от или от приблизительно 600 об/мин до или до приблизительно 1700 об/мин (например, составляющей или составляющей приблизительно или по меньшей мере 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин, или 1700 об/мин), такой как при RCF в образце или на стенке камеры или другом контейнере от или от приблизительно 80 g до 100 g (например, составляющей или составляющей приблизительно или по меньшей мере 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах осуществления вращение проводят с использованием повторных интервалов вращения при такой низкой скорости с последующим периодом выдерживания, например, при вращении и/или выдерживании в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, таких как вращение приблизительно 1 или 2 секунды с последующим перерывом в течение приблизительно 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0217] В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность инкубации, например со стимулирующим средством, составляет от или от приблизительно 1 часа до 96 часов, от 1 часа до 72 часов, от 1 часа до 48 часов, от 4 часов

до 36 часов, от 8 часов до 30 часов или от 12 часов до 24 часов, например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов или 72 часа. В некоторых вариантах осуществления дополнительно инкубирование проводят в течение некоторого времени от или от приблизительно 1 часа до 48 часов, от 4 часов до 36 часов, от 8 часов до 30 часов или от 12 часов до 24 часов, включительно.

С. Генетическая модификация

[0218] В некоторых вариантах осуществления стадии обработки включают введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок. Такие рекомбинантные белки включают рекомбинантные рецепторы, такие как описанные в настоящем описании. Введение молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, в клетку может быть выполнено с помощью любого из многих известных векторов. Такие векторы включают вирусные и невирусные системы, включая лентивирусные и гаммаретровирусные системы, а также системы на основе транспозонов, такие как системы переноса генов на основе PiggyBac или Sleeping Beauty. Примеры способов включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе с помощью вирусных векторов, например, ретровирусных или лентивирусных, трансдукции, транспозонов и электропорации.

[0219] В некоторых вариантах осуществления перенос генов осуществляют сначала путем стимуляции клетки, например, путем объединения ее со стимулом, который индуцирует ответ, такой как пролиферацию, выживание и/или активацию, например, измеряемый по экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до количества, достаточного для клинического применения.

[0220] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки при использовании рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV) и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки при использовании рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гаммаретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 November 29(11):550-557).

[0221] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор содержит последовательность длинного концевой повтора (LTR), например, ретровирусный вектор, полученный из вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса мышинных эмбриональных стволовых клеток (MESV), вируса мышинных стволовых клеток (MSCV), фокус-формирующего вируса некроза селезенки (SFFV) или вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). В некоторых вариантах

осуществления ретровирусы включают вирусы, полученные из любой клетки птицы или млекопитающего в качестве источника. Ретровирусы, как правило, являются амфотропными, что означает то, что они способны инфицировать клетки-хозяева из организмов нескольких видов, включая человека. В одном варианте осуществления ген, который должен экспрессироваться, заменяет ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Было описано множество иллюстративных ретровирусных систем (например, патенты США 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; и Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109).

[0222] Способы лентивирусной трансдукции известны. Примеры таких способов описаны, например, в публикациях Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9):689-701; Cooper et al. (2003) *Blood*. 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506:97-114; и Cavalieri et al. (2003) *Blood*. 102(2):497-505..

[0223] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки путем электропорации (см., например, Chicaibam et al, (2013) *PLoS ONE* 8(3):e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16):1431-1437). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки путем транспозиции (см., например, Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; и Huang et al. (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126). Другие способы введения и экспрессии генетического материала в иммунных клетках включают трансфекцию с фосфатом кальция (например, как описано в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York. N.Y.), слияние протопластов, опосредованную катионными липосомами трансфекцию; бомбардировку с использованием микрочастиц вольфрама (Johnston, *Nature*, 346:776-777 (1990)); и совместное осаждение ДНК фосфатом стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7:2031-2034 (1987)).

[0224] Другие методы и векторы для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, описаны, например, в публикации международной заявки WO2014055668 и патенте США 7,446,190.

[0225] В некоторых вариантах осуществления клетки, например Т-клетки, могут быть трансфицированы во время или после экспансии, например, Т-клеточным рецептором (TCR) или химерным антигенным рецептором (CAR). Такая трансфекция с целью введения гена требуемого рецептора может быть выполнена, например, с использованием любого подходящего ретровирусного вектора. Затем популяцию генетически модифицированных клеток можно освободить от начального стимула (например, стимула CD3/CD28) и после этого стимулировать вторым типом стимула, например, посредством *de novo* введенного рецептора). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме молекулы пептида/МНС, когнатного (перекрестно сшивающего) лиганда генетически введенного рецептора (например, природного лиганда

CAR) или любого лиганда (такого как антитело), который непосредственно связывается в каркасной структуре нового рецептора (например, при распознавании константных областей в рецепторе). См., 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).

[0226] В некоторых случаях может использоваться вектор, который не требует, чтобы клетки, например Т-клетки, были активированы. В некоторых таких случаях клетки могут быть отобраны и/или трансдуцированы до активации. Таким образом, клетки могут быть модифицированы до или после культивирования клеток и, в некоторых случаях, во время или в течение, по меньшей мере, части культивирования.

[0227] В некоторых аспектах клетки дополнительно модифицированы, чтобы вызывать экспрессию цитокинов или других факторов. Дополнительные нуклеиновые кислоты, например, гены для введения, включают гены, которые улучшают эффективность терапии, например, путем повышения жизнеспособности и/или функции переносимых клеток; гены для обеспечения генетического маркера для отбора и/или оценки клеток, например, для оценки выживания или локализации *in vivo*; гены для повышения безопасности, например, делающие клетку восприимчивой к отрицательному отбору *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); см. также публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 (Lupton et al.), в которых описано применение бифункциональных селективных слитых генов, полученных при слиянии доминантного положительного селективного маркера с отрицательным селективным маркером. См., например, Riddell et al., патент США 6,040,177, в колонках 14-17.

[0228] В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют путем контакта одной или более клеток композиции с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления контакт можно осуществлять при центрифугировании, например, спинокуляции (например, центробежной инокуляции). Такие способы включают любые из способов, описанных в международной публикации WO2016/073602. Примерные центрифужные камеры включают камеры, выпускаемые и продаваемые Biosafe SA, включая камеры для применения с системами Sepax® и Sepax® 2, в том числе центробежные камеры A-200/F и A-200, а также различные наборы для применения с такими системами. Примеры камер, систем, а также технологического оборудования и шкафов описаны, например, в патенте США 6,125,555, патенте США 6,733,433 и опубликованной заявке на патент, публикации US 2008/0171951, а также опубликованной международной заявке, публикации WO 00/38762, содержание которых полностью включено в настоящее описание путем ссылки. Примеры наборов для применения с такими системами включают, без ограничения перечисленными, одноразовые наборы, продаваемые BioSafe SA под торговыми наименованиями CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 или CS-900.2.

[0229] В некоторых вариантах осуществления система включена и/или помещена в сочетании с другим оборудованием, в том числе оборудованием для управления, автоматизации, контроля и/или мониторинга аспектов стадии трансдукции и одного или более других различных стадий обработки, выполняемых в системе, например, одной или более стадий обработки, которые могут проводить с помощью или в отношении системы центробежных камер, как описано в настоящем описании или в международной публикации WO2016/073602. Это оборудование в некоторых вариантах осуществления содержится внутри шкафа. В некоторых вариантах осуществления измерительная аппаратура включает шкаф, который включает корпус, содержащий блок управления, центрифугу, крышку, двигатели, насосы, датчики, дисплей и пользовательский интерфейс. Пример устройства описан в патенте США 6,123,655, патенте США 6,733,433 и US 2008/0171951.

[0230] В некоторых вариантах осуществления система содержит ряд контейнеров, например, мешков, трубок, задвижек, зажимов, соединителей и центрифужную камеру. В некоторых вариантах осуществления контейнеры, такие как мешки, включают один или более контейнеров, таких как мешки, содержащие клетки, подлежащие трансдукции, и вирусные векторные частицы, в одном контейнере или отдельных контейнерах, таких как один и тот же мешок или отдельные мешки. В некоторых вариантах осуществления система дополнительно включает один или более контейнеров, таких как мешки, содержащие среду, такую как разбавитель и/или промывочный раствор, который поступает в камеру, и/или другие компоненты для разбавления, ресуспендирования и/или промывки компонентов и/или композиции во время осуществления способов. Контейнеры могут быть соединены в одном или нескольких положениях в системе, например, в положении, соответствующем впускной линии, линии разбавителя, линии промывки, линии сброса и/или выпускной линии.

[0231] В некоторых вариантах осуществления камера связана с центрифугой, которая способна осуществлять вращение камеры, например, вокруг ее оси вращения. Вращение может происходить до, во время и/или после инкубации в связи с трансдукцией клеток и/или на одной или более других стадий обработки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления одну или более различных стадий обработки проводят при вращении, например, с конкретной силой. Камера обычно способна к вертикальному или в целом вертикальному вращению, при этом камера располагается вертикально во время центрифугирования, и боковая стенка и ось являются вертикальными или в целом вертикальными, причем торцевая стенка(и) расположена горизонтально или в целом горизонтально.

[0232] В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую клетки, вектор, например вирусные частицы, и реагент, могут вращать, обычно с относительно низкой силой или скоростью, такой как скорость ниже, чем используемая для осаждения клеток, такая как от или от приблизительно 600 об/мин до 1700 об/мин (например, составляющая или составляющая приблизительно или по меньшей мере 600 об/мин, 1000

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

[0233] В некоторых вариантах осуществления, во время, по меньшей мере, части генетической модификации, например, трансдукции, и/или после генетической модификации клетки переносят в контейнер, такой как мешок, например, модульный мешок биореактора для культуры генетически модифицированных клеток, например, для культивирования или размножения клеток, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления контейнер для культивирования или размножения клеток является мешком биореактора, таким как перфузионный мешок.

а. Получение вирусных векторных частиц для трансдукции

[0234] Вирусный векторный геном, как правило, конструируют в форме плазмиды, которая может быть трансфицирована в упаковывающую или продуцирующую клеточную линию. В любом из таких примеров нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, встроена или расположена в области вирусного вектора, обычно в такой как несущественная область вирусного генома. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота встроена в вирусный геном вместо некоторых вирусных последовательностей, с получением вируса, который является репликационно-дефектным.

[0235] 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 вирусных векторов гетерологичная нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, такой как антигенный рецептор, такой как CAR, содержится и/или расположена между 5'-LTR и 3'-LTR последовательностями векторного генома.

[0236] В некоторых вариантах осуществления вирусный векторный геном представляет собой геном лентивируса, такой как геном ВИЧ-1 или геном ВАО. Например, лентивирусные векторы были получены путем многократного ослабления генов вирулентности, например, гены *env*, *vif*, *vpr* и *nef* могут быть удалены, что делает вектор более безопасным для терапевтических целей. Лентивирусные векторы известны.

См. Naldini et al., (1996 и 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США 6,013,516 и 5,994,136). В некоторых вариантах осуществления эти вирусные векторы основаны на плаزمидях или вирусах и способны нести последовательности, необходимые для встраивания чужеродной нуклеиновой кислоты, для отбора и для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Известные лентивирусы могут быть легко получены из депозитариев или коллекций, таких как Американская коллекция типовых культур ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209), или выделены из известных источников с использованием общедоступных методик.

[0237] Неограничивающие примеры лентивирусных векторов включают векторы, полученные из лентивируса, такого как вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), ВИЧ-2, вирус иммунодефицита обезьян (ВИО), Т-лимфотропный вирус человека 1 (HTLV-1), HTLV-2 или вирус инфекционной анемии лошадей (ИНАН). Например, лентивирусные векторы были получены путем множественного ослабления генов вирулентности ВИЧ, например, удаления генов *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* и *nef*, что делает вектор более безопасным в терапевтических целях. Лентивирусные векторы известны в уровне техники, см. Naldini et al., (1996 и 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США 6,013,516 и 5,994,136). В некоторых вариантах осуществления эти вирусные векторы основаны на плазмидях или основаны на вирусах и способны нести существенные последовательности для слияния чужеродной нуклеиновой кислоты для отбора и для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Известные лентивирусы могут быть с легкостью получены из депозитариев или коллекций, таких как Американская коллекция типовых культур ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209), или выделены из известных источников с использованием общедоступных методик.

[0238] В некоторых вариантах осуществления вектор на основе вирусного генома может содержать 5' и 3'-LTR последовательности ретровируса, такого как лентивирус. В некоторых аспектах конструкция на основе вирусного генома может содержать последовательности из 5' и 3'-LTR лентивируса, и, в частности, может содержать R и U5 последовательности из 5'-LTR лентивируса, а также инактивированный или самоинактивирующийся 3'-LTR из лентивируса. Последовательности LTR могут быть последовательностями LTR из любого лентивируса любых биологических видов. Например, они могут быть последовательностями LTR из ВИЧ, ВИО, ВИК или ВБИ. Как правило, последовательности LTR являются последовательностями LTR ВИЧ.

[0239] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота вирусного вектора, такого как ВИЧ вирусный вектор, не содержит дополнительных транскрипционных единиц. Векторный геном может содержать инактивированные или самоинактивирующиеся 3'-LTR (Zufferey et al. J Virol 72:9873, 1998; Miyoshi et al., J Virol 72:8150, 1998). Например, делеция в U3 области 3'-LTR нуклеиновой кислоты, используемой для продукции вирусной векторной РНК, может использоваться для создания самоинактивирующихся (SIN) векторов. Эта делеция может быть затем перенесена в 5'-LTR провирусной ДНК в ходе обратной транскрипции.

Самоинактивирующийся вектор обычно имеет делецию энхансерных и промоторных последовательностей из 3' длинного концевой повтора (LTR), который копируется в 5'-LTR в ходе интеграции вектора. В некоторых вариантах осуществления могут быть удалены последовательности, включая удаление TATA-бокса, что достаточно для устранения транскрипционной активности LTR. Это может предотвратить продукцию полноразмерной векторной РНК в трансдуцированных клетках. В некоторых аспектах U3 элемент 3'-LTR содержит делецию своей энхансерной последовательности, TATA-бокса, Sp1 и NF-каппа В сайтов. В результате самоинактивации 3'-LTR, провирус, который образуется после проникновения в клетку и обратной транскрипции, содержит инактивированный 5'-LTR. Это может повысить безопасность путем снижения риска мобилизации векторного генома и влияния LTR на соседние клеточные промоторы. Самоинактивирующийся 3'-LTR может быть сконструирован любым способом, известным в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления это не влияет на векторные титры или свойства вектора *in vitro* или *in vivo*.

[0240] Необязательно, U3 последовательность из лентивирусного 5'-LTR в вирусной конструкции может быть заменена промоторной последовательностью, такой как гетерологичная промоторная последовательность. Это может увеличить титр вируса, выделенного из упаковывающей клеточной линии. Также может быть включена энхансерная последовательность. Может использоваться любая комбинация энхансера/промотора, повышающая экспрессию вирусного РНК генома в упаковывающей клеточной линии. В одном примере используется последовательность энхансера/промотора ЦМВ (патент США 5,385,839 и патент США 5,168,062).

[0241] В некоторых вариантах осуществления риск инсерционного мутагенеза можно свести к минимуму путем конструирования ретровирусного векторного генома, такого как лентивирусный векторный геном, не способный к интеграции. Различные методы могут использоваться для получения неинтегрирующегося векторного генома. В некоторых вариантах осуществления мутация(и) может быть введена в компонент фермента интегразы гена *pol*, в результате чего он кодирует белок с неактивной интегразой. В некоторых вариантах осуществления можно модифицировать сам векторный геном, чтобы предотвратить интеграцию, например, путем мутации или удаления одного или обоих сайтов прикрепления, или сделав 3'-LTR-проксимальный полипуриновый тракт (PPT) нефункциональным посредством делеции или модификации. В некоторых вариантах осуществления доступны негенетические подходы; они включают фармакологические средства, которые ингибируют одну или более функций интегразы. Такие методы не являются взаимоисключающими; то есть можно одновременно использовать больше одного из них. Например, как сайты интегразы, так и сайты прикрепления могут быть нефункциональными, или могут быть нефункциональными сайт интегразы и PPT, или могут быть нефункциональными сайты прикрепления и сайт PPT, или все они могут быть нефункциональными. Такие методы и вирусные векторные геномы известны и доступны (см. Philpott and Thrasher, Human Gene Therapy 18:483, 2007;

Engelman et al. J Virol 69:2729, 1995; Brown et al J Virol 73:9011 (1999); WO 2009/076524; McWilliams et al., J Virol 77:11150, 2003; Powell and Levin J Virol 70:5288, 1996).

[0242] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательности для размножения в клетке-хозяине, такой как прокариотическая клетка-хозяин. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота вирусного вектора содержит одну или более точек начала репликации для размножения в прокариотической клетке, такой как бактериальная клетка. В некоторых вариантах осуществления векторы, включающие прокариотическую точку начала репликации, также могут содержать ген, экспрессия которого дает поддающийся обнаружению или селективный маркер, такой как устойчивость к лекарственному средству.

[0243] Любой из множества известных методов может использоваться для получения ретровирусных частиц, геном которых содержит РНК копию вирусного векторного генома. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два компонента участвуют в создании системы доставки гена на основе вируса: во-первых, упаковывающие плазмиды, включающие структурные белки, а также ферменты, необходимые для создания вирусной векторной частицы, и во-вторых, сам вирусный вектор, т.е. генетический материал, который подлежит переносу. Меры гарантии биобезопасности могут быть введены в дизайн одного или обоих таких компонентов.

[0244] В некоторых вариантах осуществления упаковывающая плаزمида может содержать все ретровирусные белки, например, из ВИЧ-1, кроме белков оболочки (Naldini et al., 1998). В других вариантах осуществления вирусные векторы могут не содержать дополнительных вирусных генов, таких как гены, которые связаны с вирулентностью, например, *vpr*, *vif*, *vpr* и *nef*, и/или *Tat*, основной транскриптор ВИЧ. В некоторых вариантах осуществления лентивирусные векторы, такие как лентивирусные векторы на основе ВИЧ, включают только три гена исходного вируса: *gag*, *pol* и *rev*, что снижает или исключает возможность воссоздания вируса дикого типа в результате рекомбинации.

[0245] В некоторых вариантах осуществления вирусный векторный геном вводят в упаковывающую клеточную линию, содержащую все компоненты, необходимые для упаковки вирусной геномной РНК, транскрибированной с вирусного векторного генома, в вирусные частицы. В альтернативе вирусный векторный геном может включать один или более генов, кодирующих вирусные компоненты в дополнение к одной или более последовательностям, например, рекомбинантным нуклеиновым кислотам, представляющим интерес. В некоторых аспектах для предотвращения репликации генома в клетке-мишени, тем не менее, эндогенные вирусные гены, требуемые для репликации, удаляют и предоставляют отдельно в упаковывающей клеточной линии.

[0246] В некоторых вариантах осуществления упаковывающую клеточную линию трансфицируют одним или более плазмидными векторами, содержащими компоненты, необходимые для формирования частиц. В некоторых вариантах осуществления упаковывающую клеточную линию трансфицируют плазмидой, содержащей вирусный векторный геном, включающий LTR повторы, *цис*-действующую упаковывающую

последовательность и последовательность, представляющую интерес, т.е. нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный рецептор, такой как CAR; и одной или более хэлперных плазмид, кодирующих ферментные и/или структурные компоненты вируса, такие как Gag, pol и/или rev. В некоторых вариантах осуществления множество векторов используют для разделения различных генетических компонентов, которые формируют ретровирусные векторные частицы. В некоторых таких вариантах осуществления введение отдельных векторов в упаковывающую клетку уменьшает шанс событий рекомбинации, которые могут в иных условиях приводить к появлению репликационно-компетентных вирусов. В некоторых вариантах осуществления может использоваться один плазмидный вектор, содержащий все ретровирусные компоненты.

[0247] В некоторых вариантах осуществления ретровирусную векторную частицу, такую как лентивирусная векторная частица, псевдотипируют для увеличения эффективности трансдукции клеток-хозяев. Например, ретровирусную векторную частицу, такую как лентивирусная векторная частица, в некоторых вариантах осуществления псевдотипируют гликопротеином VSV-G, что обеспечивает широкий спектр клеток-хозяев с расширением типов клеток, которые могут быть трансдуцированы. В некоторых вариантах осуществления упаковывающую клеточную линию трансфицируют плазмидой или полинуклеотидом, кодирующим ненативный гликопротеин оболочки, например, с включением ксенотропных, политропных или амфотропных оболочек, таких как оболочка вируса Синдбис, GALV или VSV-G.

[0248] В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клеточная линия обеспечивает компоненты, включающие вирусные регуляторные и структурные белки, которые требуются в транс-конфигурации для упаковки вирусной геномной РНК в лентивирусные векторные частицы. В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клеточная линия может быть любой клеточной линией, которая способна к экспрессии лентивирусных белков и к продукции функциональных лентивирусных векторных частиц. В некоторых аспектах подходящие упаковывающие клеточные линии включают клетки 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLa (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) и Cf2Th (ATCC CRL 1430).

[0249] В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клеточная линия стабильно экспрессирует вирусный белок(ки). Например, в некоторых аспектах может быть сконструирована упаковывающая клеточная линия, содержащая gag, pol, rev и/или другие структурные гены, но без LTR и упаковывающих компонентов. В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клеточная линия может быть транзистентно трансфицирована молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими один или более вирусных белков наряду с вирусным векторным геномом, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую гликопротеин оболочки.

[0250] В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы и упаковывающие и/или хэлперные плазмиды вводят путем трансфекции или инфицирования в

упаковывающую клеточную линию. Упаковывающая клеточная линия дает вирусные векторные частицы, содержащие вирусный векторный геном. Способы трансфекции или инфицирования известны. Неограничивающие примеры включают методы с использованием фосфата кальция, DEAE-декстрана и липофекции, электропорацию и микроинъекцию.

[0251] При введении рекомбинантной плазмиды и ретровирусных LTR и упаковывающих последовательностей в специальную клеточную линию (например, при осаждении фосфатом кальция), упаковывающие последовательности могут обеспечивать упаковку РНК транскрипта рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем могут секретироваться в среду культивирования. Затем среды, содержащие рекомбинантные ретровирусы, в некоторых вариантах осуществления собирают, необязательно концентрируют и используют для переноса генов. Например, в некоторых аспектах, после котрансфекции упаковывающих плазмид и трансферного вектора в упаковывающую клеточную линию вирусные векторные частицы выделяют из сред культивирования и титруют с помощью стандартных методов, используемых специалистами.

[0252] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, может быть получен в упаковывающей клеточной линии, такой как примерная линия клеток НЕК 293Т, путем введения плазмид для формирования лентивирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клетка трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий gag и pol, и полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, такой как антигенный рецептор, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клеточная линия необязательно и/или дополнительно трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий белок rev. В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клеточная линия необязательно и/или дополнительно трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий ненативный гликопротеин оболочки, такой как VSV-G. В некоторых таких вариантах осуществления, приблизительно через два дня после трансфекции клеток, например, клеток НЕК 293Т, супернатант клеток содержит рекомбинантные лентивирусные векторы, которые могут быть выделены и оттитрованы.

[0253] Выделенные и/или продуцированные ретровирусные векторные частицы можно использовать для трансдукции клеток-мишеней с использованием описанных способов. При введении в клетки-мишени вирусная РНК подвергается обратной транскрипции, импортируется в ядро и стабильно интегрируется в хозяйский геном. Через один или два дня после интеграции вирусной РНК может быть обнаружена экспрессия рекомбинантного белка, например, антигенного рецептора, такого как CAR.

[0254] В некоторых вариантах осуществления способы включают трансдукцию клеток путем контакта, например, инкубации, композиции клеток, включающей множество клеток с вирусной частицей. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые требуется трансфицировать или трансдуцировать, представляют собой или

включают первичные клетки, полученные у субъекта, такие как клетки, обогащенные и/или отобранные у субъекта.

[0255] В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток, подлежащих трансдукции, в композиции составляет от или от приблизительно $1,0 \times 10^5$ клеток/мл до $1,0 \times 10^8$ клеток/мл, например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или приблизительно $1,0 \times 10^5$ клеток/мл, 5×10^5 клеток/мл, 1×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 1×10^7 клеток/мл, 5×10^7 клеток/мл или 1×10^8 клеток/мл.

[0256] В некоторых вариантах осуществления вирусные частицы предоставляют в некотором отношении копий частиц вирусного вектора или их инфекционных единиц (ИЕ) к общему количеству клеток, подлежащих трансдукции (ИЕ/клетка). Например, в некоторых вариантах осуществления вирусные частицы присутствуют во время контакта в количестве, составляющем или составляющем приблизительно или по меньшей мере или приблизительно 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или 60 ИЕ частиц вирусного вектора на одну из клеток.

[0257] В некоторых вариантах осуществления титр вирусных векторных частиц составляет от или от приблизительно 1×10^6 ИЕ/мл до 1×10^8 ИЕ/мл, например, от или от приблизительно 5×10^6 ИЕ/мл до 5×10^7 ИЕ/мл, например, по меньшей мере 6×10^6 ИЕ/мл, 7×10^6 ИЕ/мл, 8×10^6 ИЕ/мл, 9×10^6 ИЕ/мл, 1×10^7 ИЕ/мл, 2×10^7 ИЕ/мл, 3×10^7 ИЕ/мл, 4×10^7 ИЕ/мл или 5×10^7 ИЕ/мл.

[0258] В некоторых вариантах осуществления трансдукция может быть выполнена при множественности инфицирования (MOI) меньше 100, такой как обычно меньше 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 или меньше.

[0259] В некоторых вариантах осуществления способ включает контакт или инкубирование клеток с вирусными частицами. В некоторых вариантах осуществления контакт осуществляется в течение от 30 минут до 72 часов, например, от 30 минут до 48 часов, от 30 минут до 24 часов или от 1 часа до 24 часов, например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 30 минут, 1 часа, 2 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов или больше.

[0260] В некоторых вариантах осуществления контакт производят в растворе. В некоторых вариантах осуществления клетки и вирусные частицы подвергают контакту в объеме от или от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 500 мл, таком как от или от приблизительно 0,5 мл до 200 мл, от 0,5 мл до 100 мл, от 0,5 мл до 50 мл, от 0,5 мл до 10 мл, от 0,5 мл до 5 мл, от 5 мл до 500 мл, от 5 мл до 200 мл, от 5 мл до 100 мл, от 5 мл до 50 мл, от 5 мл до 10 мл, от 10 мл до 500 мл, от 10 мл до 200 мл, от 10 мл до 100 мл, от 10 мл до 50 мл, от 50 мл до 500 мл, от 50 мл до 200 мл, от 50 мл до 100 мл, от 100 мл до 500 мл, от 100 мл до 200 мл или от 200 мл до 500 мл.

[0261] В некоторых вариантах осуществления исходные клетки обрабатывают, инкубируют или подвергают контакту с частицами, которые включают связывающие молекулы, которые связывают или распознают рекомбинантный рецептор, кодируемый вирусной ДНК.

[0262] В некоторых вариантах осуществления инкубирование клеток с вирусными векторными частицами приводит к получению или продукции готовой композиции, включающей клетки, трансдуцированные вирусными векторными частицами.

D. Культивирование и/или размножение клеток

[0263] В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению включают одну или более стадий культивирования модифицированных клеток, например, культивирования клетки в условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления модифицированные клетки культивируют в условиях, которые вызывают пролиферацию и/или размножение, после стадии генетической модификации, например, введения рекомбинантного полипептида в клетки при трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют после инкубации клеток при стимулирующих условиях и трансдукции или трансфекции рекомбинантным полинуклеотидом, например, полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления в результате культивирования получают одну или более культивированных композиций обогащенных Т-клеток.

[0264] В некоторых вариантах осуществления модифицированные клетки культивируют в контейнере, который может быть наполнен, например, через порт для наполнения средой для клеток и/или клетками для культивирования добавленных клеток. Клетки могут быть из любого источника клеток, для которого необходима культура клеток, например, для экспансии и/или пролиферации клеток.

[0265] В некоторых аспектах среда для культивирования является адаптированной средой для культивирования, которая поддерживает рост, культивирование, размножение или пролиферацию клеток, таких как Т-клетки. В некоторых аспектах питательная среда может быть жидкостью, содержащей смесь солей, аминокислот, витаминов, сахаров или их любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования дополнительно содержит одно или более стимулирующих условий или средств, например, для стимуляции культивирования, размножения или пролиферации клеток во время инкубации. В некоторых вариантах осуществления стимулирующее условие представляет собой или включает один или более цитокинов, выбранных из IL-2, IL-7 или IL-15. В некоторых вариантах осуществления цитокин является рекомбинантным цитокином. В некоторых вариантах осуществления концентрация одного или более цитокинов в среде культивирования во время культивирования или инкубации независимо составляет от или от приблизительно 1 МЕ/мл до 1500 МЕ/мл, например, от или от приблизительно 1 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 2 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 5 МЕ/мл до 10 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 250 МЕ/мл или от 100 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 1500 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл или от 200 МЕ/мл до 600 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация одного или более цитокинов независимо составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1 МЕ/мл, 5 МЕ/мл, 10 МЕ/мл, 50 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 500 МЕ/мл, 1000 МЕ/мл или 1500 МЕ/мл.

[0266] В некоторых аспектах клетки инкубируют в течение по меньшей мере части времени после переноса модифицированных клеток и сред для культивирования. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия обычно включают температуру, подходящую для роста первичных иммунных клеток, таких как человеческие Т-лимфоциты, например, по меньшей мере приблизительно 25 градусов Цельсия, как правило, по меньшей мере приблизительно 30 градусов и обычно от или от приблизительно 37 градусов Цельсия. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют при температуре 25-38 градусов Цельсия, такой как 30-37 градусов Цельсия, например, от или от приблизительно 37 градусов Цельсия ± 2 градуса Цельсия. В некоторых вариантах осуществления инкубирование проводят в течение некоторого периода времени, пока культура, например, культивирование или экспансия, не приведет к требуемой или пороговой плотности, количеству или дозе клеток. В некоторых вариантах осуществления инкубирование проводят в течение больше чем или больше чем приблизительно или в течение приблизительно 24 часов, 48 часов, 72 часов, 96 часов, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или больше.

[0267] В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют при условиях, позволяющих поддерживать целевое количество диоксида углерода в культуре клеток. В некоторых аспектах это гарантирует оптимальное культивирование, экспансию и пролиферацию клеток во время роста. В некоторых аспектах количество диоксида углерода (CO₂) составляет от 10% до 0% (об/об) указанного газа, например, от 8% до 2% (об/об) указанного газа, например, количество 5% или приблизительно 5% (об/об) CO₂.

[0268] В конкретных вариантах осуществления культивирование проводят в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят в закрытой системе в стерильных условиях. В конкретных вариантах осуществления культивирование проводят в той же закрытой системе, что и одну или более стадий предложенных систем. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток удаляют из закрытой системы и помещают в и/или соединяют с биореактором для культивирования. Примеры подходящих биореакторов для культивирования включают, без ограничения перечисленными, GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20/50, системы Finesse SmartRocker Bioreactor и системы Pall XRS Bioreactor. В некоторых вариантах осуществления биореактор используют чтобы перфузии и/или смешивания клеток в течение по меньшей мере части стадии культивирования. В некоторых вариантах осуществления смешивание представляет собой или включает качание и/или движение.

[0269] В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют с использованием контейнеров, например, мешков, которые используют в сочетании с биореактором. В некоторых случаях биореактор может подвергаться движению или качанию, которое, в некоторых аспектах, может увеличить перенос кислорода. Приведение биореактора в движение может включать, без ограничения перечисленным, вращение вдоль горизонтальной оси, вращение вдоль вертикальной оси, качание вдоль

наклонной или наклоненной горизонтальной оси биореактора или их любую комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубации проводят с качанием. Скорость качания и угол качания могут регулировать так, чтобы достигнуть требуемого перемешивания. В некоторых вариантах осуществления угол качания составляет или приблизительно составляет 20°, 19°, 18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2° или 1°. В некоторых вариантах осуществления угол качания составляет 6-16°. В других вариантах осуществления угол качания составляет 7-16°. В других вариантах осуществления угол качания составляет 8-12°. В некоторых вариантах осуществления скорость качания составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 об/мин. В некоторых вариантах осуществления скорость качания составляет 4-12 об/мин, например, 4-6 об/мин, включительно. По меньшей мере часть экспансии клеточной культуры выполняют с качанием, таким как под углом от 5° до 10°, таким как 6°, при постоянной скорости качания, такой как скорость 5-15 об/мин, такая как 6 об/мин или 10 об/мин. В некоторых вариантах осуществления биореактор поддерживает температуру на уровне или около 37°C и уровни CO₂ 5% или около 5% при скорости стационарного потока воздуха, составляющей, составляющей приблизительно или по меньшей мере 0,01 л/мин, 0,05 л/мин, 0,1 л/мин, 0,2 л/мин, 0,3 л/мин, 0,4 л/мин, 0,5 л/мин, 1,0 л/мин, 1,5 л/мин или 2,0 л/мин или больше чем 2,0 л/мин. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть культивирования проводят с перфузией, такой как со скоростью 290 мл/день, 580 мл/день и/или 1160 мл/день, например, в зависимости от времени относительно начала культивирования и/или от плотности культурных клеток. В некоторых вариантах осуществления CD4⁺ и CD8⁺ клетки размножают отдельно, пока они не достигнут порогового количества или плотности клетки.

[0270] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации проводят в статических условиях. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации проводят с перфузией, например, для перфузии отработанной среды и перфузии в свежей среде во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию перфузии свежей среды для культивирования в клеточную культуру, например через порт для наполнения. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования, добавляемая во время перфузии, содержит один или более стимулирующих средств, например, один или более рекомбинантных цитокинов, таких как IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования, добавляемая во время перфузии, является такой же средой, которая используется во время статической инкубации.

[0271] В некоторых вариантах осуществления, после инкубации, контейнер, например мешок, повторно подсоединяют к системе для выполнения одной или более других стадий обработки для производства, создания или получения клеточной терапии, например, повторно подсоединяют к системе, содержащей центрифужную камеру. В некоторых аспектах культивируемые клетки поступают от мешка во внутреннюю полость

камеры для изготовления состава культивируемых клеток.

[0272] В некоторых вариантах осуществления способы производства, создания или получения клеточной терапии и/или модифицированных клеток могут включать состав клеток, такой как состав генетически модифицированных клеток, полученный на стадиях обработки, до или после инкубации, модификации и культивирования, и/или одной или более других стадий обработки, как описано. В некоторых вариантах осуществления одна или более стадий обработки, включая изготовление состава клеток, может быть осуществлена в закрытой системе. В некоторых случаях клетки обрабатывают на одной или более стадий (например, осуществляемой в центрифужной камере и/или закрытой системе) для производства, создания или получения клеточной терапии, и/или модифицированные клетки могут включать состав клеток, такой как состав генетически модифицированных клеток, полученный на стадиях обработки путем трансдукции, до или после культивирования, например культивирования и экспансии, и/или одного или более других стадий обработки, как описано.

Е. Композиции и составы

[0273] В некоторых вариантах осуществления доза клеток, включающих клетки, модифицированные рекомбинантным антигенным рецептором, например, CAR или TCR, предоставляют в виде композиции или состава, таких как фармацевтическая композиция или состав. Такие композиции могут использоваться в соответствии со способами адоптивной клеточной терапии, включая способы предупреждения или лечения заболеваний, состояний и нарушений, или в способах обнаружения, диагностики и прогнозирования.

[0274] В некоторых случаях одна или более стадий (например, проводимых в центрифужной камере и/или закрытой системе) для производства, создания или получения клеточной терапии, и/или модифицированные клетки могут включать изготовление состава клеток, таких как состав генетически модифицированных клеток, полученный на стадиях обработки по изобретению путем трансдукции, до или после культивирования, например, культивирования и размножения, и/или одного или более других стадий обработки, как описано. В некоторых случаях клетки могут быть включены в состав в количестве для введения дозы, например, для введения единичной стандартной дозы или введения многократных доз. В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению, связанные с готовым составом клеток, включают обработку трансдуцированных клеток, таких как клетки, трансдуцированные и/или размноженные с использованием использованием стадий обработки, описанных выше, в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления клетки в составе могут быть помещены или введены в емкости для биомедицинских материалов, например, флаконы.

[0275] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, такие как CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки, полученные на одной или более стадий обработки, включают в состав. В некоторых аспектах отдельно производят, получают или создают множество композиций, каждая из которых содержит определенную популяцию и/или подтипы клеток субъекта,

например, для введения отдельно или независимо, необязательно в течение определенного периода времени. Например, отдельные составы модифицированных клеток, содержащие разные популяции или подтипы клеток, могут включать $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки, соответственно, и/или $CD8^+$ - и $CD4^+$ -обогащенные популяции, соответственно, например, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клетки индивидуально включают клетки, генетически модифицированные для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну композицию включают в состав с $CD4^+$ Т-клетками, генетически модифицированными для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну композицию включают в состав с $CD8^+$ Т-клетками, генетически модифицированными для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления введение дозы включает введение первой композиции, включающей дозу $CD8^+$ Т-клеток или дозу $CD4^+$ Т-клеток, и введение второй композиции, включающей другую дозу $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления первая композиция, включающая дозу $CD8^+$ Т-клеток или дозу $CD4^+$ Т-клеток, вводят до второй композиции, включающей другую дозу $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления введение дозы включает введение композиции, включающей дозу $CD8^+$ Т-клеток и дозу $CD4^+$ Т-клеток.

[0276] В некоторых вариантах осуществления клетки включают в состав в фармацевтически приемлемом буфере, который в некоторых аспектах может включать фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления обработка включает замену среды средой или буфером для состава, который является фармацевтически приемлемым или требуемым для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления стадии обработки могут включать промывку трансдуцированных и/или размноженных клеток с заменой среды клеток фармацевтически приемлемым буфером, который может содержать один или более необязательных фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ. Примерами таких фармацевтических форм, включающих фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества, может быть любая форма, описанная ниже, в сочетании с формами, приемлемыми для введения клеток и композиций субъекту. Фармацевтическая композиция в некоторых вариантах осуществления содержит клетки в количествах, эффективных для лечения или предупреждения заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество.

[0277] "Фармацевтически приемлемый носитель" относится к компоненту в фармацевтическом составе, кроме активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, без ограничения перечисленным, буфер, вспомогательное вещество, стабилизатор или консервант.

[0278] В некоторых аспектах выбор носителя частично определяется конкретной клеткой и/или способом введения. Таким образом, существует множество подходящих составов. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты.

Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. В некоторых аспектах используется смесь двух или более консервантов. Консервант или смесь консервантов, как правило, присутствует в количестве от приблизительно 0,0001% до приблизительно 2% в расчете на общий вес композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают, без ограничения перечисленным: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый спирт или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; пирокатехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и мета-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (меньше чем приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие соединения, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахарозу, маннит, трегалозу или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексные соединения металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0279] Буферные вещества в некоторых аспектах включают в композиции. Подходящие буферные вещества включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и другие различные кислоты и соли. В некоторых аспектах используется смесь двух или более буферных веществ. Буферное вещество или смеси буферных веществ, как правило, присутствуют в количестве от приблизительно 0,001% до приблизительно 4% в расчете на общий вес композиции. Способы получения вводимых фармацевтических композиций известны. Примеры способов описаны более подробно, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

[0280] Составы могут включать водные растворы. Состав или композиция также может содержать больше одного активного ингредиента, применяемого при конкретном показании, заболевании или состоянии, которое лечат клетками, предпочтительно активные ингредиенты с действиями, совместимыми с клетками, где соответствующие действия не оказывают негативного влияния друг на друга. Такие активные ингредиенты соответственно присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для предполагаемой цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно включает другие фармацевтически активные вещества или средства, такие как химиотерапевтические средства, например, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубин,

доксорубицин, фтороурацил, гмцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин и/или винкристин.

[0281] Композиции в некоторых вариантах осуществления представлены в виде стерильных жидких препаратов, например изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые в некоторых аспектах могут быть забуферены до выбранного pH. Жидкие композиции могут включать носители, которые могут быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, раствор хлорида натрия, фосфатно-солевой буфер, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения клеток в растворитель, например, в смеси с подходящим носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, раствор хлорида натрия, глюкоза, декстроза и т.п. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие, диспергирующие или эмульгирующие вещества (например, метилцеллюлозу), pH-буферные вещества, гелеобразующие или повышающие вязкость добавки, консерванты, вкусовые добавки и/или красители, в зависимости от требуемого пути введения и препарата. Для приготовления подходящих препаратов в некоторых аспектах можно обращаться к стандартным текстам.

[0282] Могут быть добавлены различные добавки, которые повышают стабильность и стерильность композиций, в том числе противомикробные консерванты, антиоксиданты, хелатообразующие соединения и буферы. Предотвращение действия микроорганизмов можно обеспечивать различными противобактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом и сорбиновой кислотой. Пролонгированная абсорбция фармацевтической формы для инъекций может быть достигнута при использовании веществ, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0283] В некоторых вариантах осуществления буфер для состава содержит криоконсервант. В некоторых вариантах осуществления клетку включают в состав с раствором криоконсерванта, содержащим от 1,0% до 30% раствора ДМСО, например, от 5% до 20% раствора ДМСО или от 5% до 10% раствора ДМСО. В некоторых вариантах осуществления раствор для криоконсервации представляет собой или содержит, например, PBS, содержащий 20% ДМСО и 8% человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) или другие подходящие среды для замораживания клеток. В некоторых вариантах осуществления раствор криоконсерванта представляет собой или содержит, например, по меньшей мере или приблизительно 7,5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления стадии обработки могут включать промывку трансдуцированных и/или размноженных клеток для замены среды клеток раствором криоконсерванта.

[0284] В некоторых вариантах осуществления изготовление состава осуществляют при использовании одного или более стадий обработки, включая промывку, разбавление или концентрирование клеток, таких как культивированные или размноженные клетки. В

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

[0285] В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют, например, стимулируют, модифицируют и/или культивируют в контейнере, например, мешке или центрифужной камере. В некоторых аспектах контейнер является первым контейнером, и культивируемые клетки получают или переносят из первого контейнера, например мешка или центрифужной камеры, во второй контейнер, такой как сосуд для биомедицинских материалов, который функционально соединен с первым контейнером. В некоторых вариантах осуществления сосуды для биомедицинских материалов обладают возможностью интеграции и/или функционального соединения, и/или интегрированы или функционально соединены, с первым контейнером, например мешком или центрифужной камерой, используемой на одной или более предыдущих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления сосуд для биомедицинских материалов соединен с первым контейнером, например мешком или центрифужной камерой, на выпускной линии или выпускном положении. В некоторых случаях первый контейнер, например мешок или центрифужная камера, соединен с флаконом для биомедицинских материалов на впускной трубке.

[0286] В некоторых вариантах осуществления такие стадии обработки для включения композиции клеток в состав проводят в закрытой системе. Примеры таких стадий обработки могут быть выполнены с использованием центрифужной камеры в сочетании с одной или более системами или наборами, связанными с системой обработки клеток, такой как центрифужная камера, которую производит и продает Biosafe SA, включая камеры для использования с системами обработки клеток Serax® или Serax 2®. Примерная система и способ описаны в Международной публикации WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления способ включает осуществление выпуска или переноса из внутренней полости центробежной камеры готового состава композиции, которая представляет собой готовую композицию клеток, включенную в буфер для состава, такой как фармацевтически приемлемый буфер, в любом из описанных выше вариантов осуществления. В некоторых вариантах выпуск или перенос включенной в

состав композиции производят в контейнер, такой как сосуды для биомедицинских материалов, описанные в настоящем описании, которые функционально связаны в качестве части закрытой системы с центробежной камерой. В некоторых вариантах осуществления сосуды из биомедицинского материала предназначены для интеграции и/или оперативного соединения, и/или интегрированы или оперативно связаны с закрытой системой или устройством, которое выполняет одну или более стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления сосуд для биомедицинского материала соединен с системой на выпускной линии или выпускном положении. В некоторых случаях закрытая система соединена с флаконом сосуда для биомедицинского материала на впускной трубе. Иллюстративные закрытые системы для использования с сосудами для биомедицинского материала, описанные в настоящем описании, включают системы Serax® и Serax® 2.

[0287] В некоторых вариантах осуществления композиция может быть подана из первого контейнера, такого как центрифужная камера или система обработки клеток, в сосуды для биомедицинских материалов через многопортовый выпускной набор, содержащий многоканальную магистраль, соединенную на каждом конце магистральной линии с портом, к которому может быть присоединен один или множество контейнеров, например, сосудов для биомедицинских материалов, для выпуска готового состава композиции. В некоторых аспектах требуемое количество или множество таких флаконов может быть стерильно соединено с одним или более, обычно двумя или более, например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более портами многопортового выпуска. Например, в некоторых вариантах осуществления один или более контейнеров, например, сосудов для биомедицинских материалов, могут быть присоединены к портам, или не ко всем портам. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления система может обеспечивать выпуск готовой композиции во множество флаконов сосудов для биомедицинских материалов.

[0288] В некоторых аспектах клетки могут быть выпущены или поданы в один или более из множества выпускных контейнеров, например, флаконов сосудов для биомедицинских материалов, в количестве для введения дозы, например, для введения однократной единичной дозы или для введения множества доз. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из флаконов сосудов для биомедицинских материалов может содержать количество клеток для введения в данной дозе или ее дробной части. Таким образом, каждый флакон, в некоторых аспектах, может содержать однократную единичную дозу для введения или может содержать часть требуемой дозы, при этом больше одного из множества флаконов, например, два флакона или 3 флакона, вместе составляют дозу для введения.

[0289] Таким образом, флаконы, описанные в настоящем описании, обычно содержат клетки для введения, например, одну или более единичных доз клеток. Единичная доза может быть количеством или числом клеток, вводимым субъекту, или двухкратным числом (или больше) клеток, подлежащих введению. Это может быть самая низкая доза или предельно низкая доза клеток, которую могут вводить субъекту.

[0290] В некоторых вариантах осуществления каждый из флаконов индивидуально включает единичную дозу клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления каждый из контейнеров включает одинаковое или примерно или по существу одинаковое количество клеток. В некоторых вариантах осуществления каждая единичная доза содержит по меньшей мере или по меньшей мере на уровне или приблизительно 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, 3×10^8 , $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 9×10^8 или $1,2 \times 10^9$ модифицированных клеток, всех клеток, Т-клеток или МКПК. В некоторых вариантах осуществления объем включенной в состав композиции клеток в каждом контейнере, например, мешке или флаконе, составляет от или от приблизительно 10 мл до или до приблизительно 100 мл, например, по меньшей мере или приблизительно или по меньшей мере приблизительно 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл или 100 мл. В некоторых вариантах осуществления клетки в контейнере, например, мешке или флаконе, могут быть криоконсервированы. В некоторых вариантах осуществления флаконы могут храниться в жидком азоте до последующего применения.

[0291] В некоторых вариантах осуществления такие клетки, полученные способом, или композицию, включающую такие клетки, вводят субъекту для лечения заболевания или состояния.

III. РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК

[0292] В некоторых вариантах осуществления клетки, которые обработаны, модифицированы и/или получены способами по изобретению, например, способами, описанными в Разделе I, содержат или экспрессируют или модифицированы для содержания или экспрессии рекомбинантного белка, такого как рекомбинантный рецептор, например, химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению обеспечивают получение и/или способны обеспечивать получение клеток или популяций, или композиций, содержащих клетки и/или обогащенных клетками, модифицированными для экспрессии или содержания рекомбинантного белка. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки или популяции, или композиции Т-клеток обрабатывают, модифицируют и/или получают.

[0293] В некоторых вариантах осуществления клетки включают одну или более нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантные или генетически сконструированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления перенос гена осуществляется сначала путем стимуляции клеток, например, путем объединения их со стимулом, который индуцирует ответ, такой как пролиферацию, выживание и/или активацию, например, при измерении по экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и экспансией в культуре до количеств, достаточных для клинического применения.

[0294] Рецепторы включают антигенные рецепторы и рецепторы, содержащие один или более их компонентов. Рекомбинантные рецепторы могут включать химерные

рецепторы, такие как рецепторы, содержащие лигандсвязывающие домены или их связывающие фрагменты и внутриклеточные сигнальные домены или области, функциональные не-TCR антигенные рецепторы, химерные антигенные рецепторы (CAR) и Т-клеточные рецепторы (TCR), такие как рекомбинантные или трансгенные TCR-рецепторы, химерный рецептор аутоантител (CAAR) и компоненты любого из предыдущих. Рекомбинантный рецептор, такой как CAR, обычно включает внеклеточный антиген- (или лиганд) связывающий домен, соединенный с одним или более внутриклеточными сигнальными компонентами, в некоторых аспектах через линкеры и/или трансмембранный домен(ы).

1. Химерные антигенные рецепторы (CAR)

[0295] В некоторых вариантах осуществления описаны модифицированные клетки, такие как Т-клетки, которые экспрессируют CAR со специфичностью к конкретному антигену (или маркеру или лиганду), такому как антиген, экспрессируемый на поверхности определенного типа клеток. В некоторых вариантах антиген представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления антиген селективно экспрессируется или оверэкспрессируется на клетках заболевания или состояния, например опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на модифицированных клетках.

[0296] В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор, содержит внутриклеточную сигнальную область, которая включает цитоплазматический сигнальный домен или область (также попеременно называемые внутриклеточным сигнальным доменом или областью), такую как цитоплазматическая (внутриклеточная) область, способную индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, например, цитоплазматический сигнальный домен или область компонента Т-клеточного рецептора (TCR) (например, цитоплазматический сигнальный домен или область дзета-цепи CD3 дзета-цепи (CD3 ζ) или его функциональный вариант или сигнальную часть) и/или включающий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

[0297] В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор дополнительно содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, специфично связывающийся с антигеном-лигандом (например, антигеном). В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор представляет собой CAR, содержащий домен распознавания внеклеточного антигена, который специфично связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления лиганд, такой как антиген, является белком, экспрессируемым на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления CAR является TCR-подобным CAR, а антиген является процессированным пептидным антигеном, таким как пептидный антиген внутриклеточного белка, который, как TCR, распознается на

поверхности клеток в контексте молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС).

[0298] Примерные антигенные рецепторы, в том числе CAR, и способы конструирования и введения таких рецепторов в клетки, включают описанные, например, в публикациях международных заявок WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикациях заявок на патент США US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США: 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353 и 8,479,118, и в европейской заявке на патент EP2537416, и/или описанные в Sadelain et al., *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4):e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5):633-39; Wu et al., *Cancer*, 2012 March 18(2):160-75. В некоторых аспектах антигенные рецепторы включают CAR, как описано в патенте США: 7,446,190, и рецепторы, описанные в публикации международной заявки: WO/2014055668 A1. Примеры CAR-рецепторов включают CAR, раскрытые в любой из указанных выше публикаций, таких как WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, патент США: 7,446,190, патент США: 8,389,282, Kochenderfer et al., 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; и Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177). Также см. WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, патент США: 7,446,190 и патент США: 8,389,282.

[0299] В некоторых вариантах осуществления CAR сконструирован со специфичностью к конкретному антигену (или маркеру или лиганду), такому как антиген, экспрессируемый в конкретном типе клеток, который является мишенью адоптивной терапии, например, онкомаркер, и/или антиген, предназначенный для индукции ослабляющего ответа, такой как антиген, экспрессируемый на клетках нормального или незлокачественного типа. Таким образом, CAR обычно включает в своей внеклеточной части одну или более антигенсвязывающих молекул, таких как один или более антигенсвязывающих фрагментов, доменов или частей, или один или более переменных доменов антител и/или молекул антител. В некоторых вариантах осуществления CAR включает антигенсвязывающую часть или части молекулы антитела, такие как одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), полученный из переменной области тяжелой (VH) и переменной области легкой (VL) цепей моноклонального антитела (мАт).

[0300] Термин "антитело" используется в настоящем описании в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, в том числе интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая антигенсвязывающие (Fab) фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fab-фрагменты, Fv-фрагменты, фрагменты рекомбинантных IgG (rIgG), переменные области тяжелой цепи (VH), способные специфично связывать антиген, одноцепочечные фрагменты антител, включающие одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), и однодоменные фрагменты антител (например, sdAb, sdFv, нанотело). Термин охватывает генетически

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

[0301] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты специфично распознают антиген полноразмерного антитела. В некоторых вариантах осуществления тяжелая и легкая цепи антитела могут быть полноразмерными или могут быть антигенсвязывающей частью (Fab, F(ab')₂, Fv или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv)). В других вариантах осуществления константная область тяжелой цепи антитела выбрана, например, из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE, в частности, выбрана, например, из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, более конкретно, IgG1 (например, человеческого IgG1). В другом варианте осуществления константная область легкой цепи антитела выбрана, например, из каппа или лямбда, в частности каппа.

[0302] Антитела включают фрагменты антител. "Фрагмент антитела" относится к молекуле, отличающейся от интактного антитела, которая включает часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения перечисленными, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; переменные области тяжелой цепи (V_H), одноцепочечные молекулы антител, такие как scFv и V_H однодоменные антитела; и мультиспецифичные антитела, сформированные из фрагментов антител. В конкретных вариантах осуществления антитела являются одноцепочечными фрагментами антител, включающими переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи, такие как scFv-фрагменты.

[0303] Термины "определяющая комплементарность область" и "CDR", синонимом которых является "гиперпеременная область" или "HVR", как известно, в некоторых случаях относятся к несплошным аминокислотным последовательностям в переменных областях антител, которые придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания. Как правило, в каждой переменной области тяжелой цепи присутствуют три CDR-области (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), и три CDR-области - в каждой переменной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Как известно, "каркасные области" и "FR", в некоторых случаях, относятся к не-CDR участкам переменных областей тяжелой и легкой цепей. Как правило, в каждой полноразмерной переменной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) содержится четыре FR, и в каждой полноразмерной переменной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4) - четыре FR.

[0304] Точные границы аминокислотных последовательностей данных CDR или FR могут быть легко определены при использовании любой из хорошо известных схем, в том числе описанных в публикации Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации "Кэбата"); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации "Чотиа"); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography", J. Mol. Biol. 262, 732-745 ("Контактная" схема нумерации); Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации "IMGT"); Honegger A and Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J Mol Biol, 2001 Jun 8; 309(3):657-70, (схема нумерации "Aho"); и Martin et al., "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm", PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (схема нумерации "AbM").

[0305] Границы данных CDR или FR могут варьировать в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Кэбата основана на структурных выравниваниях, тогда как схема Чотиа основана на структурной информации. Нумерация по схемам Кэбата и Чотиа основана на наиболее распространенных длинах последовательностей областей антител, где вставки, обозначенные буквами вставки, например "30a", и делеции присутствуют в некоторых антителах. Эти две схемы помещают некоторые вставки и делеции ("инделлы") в разные положения, что приводит к разной нумерации. Контактная схема основана на анализе сложных кристаллических структур и во многих отношениях аналогична схеме нумерации Чотиа. Схема AbM представляет собой компромисс между определениями Кэбата и Чотиа, и основана на определении, используемом в программе для моделирования антител AbM, разработанной Oxford Molecular.

[0306] В **Таблице 1**, ниже, перечислены примерные границы положений CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, идентифицированных в схемах Кэбата, Чотиа, AbM и Контактной схеме, соответственно. Для CDR-H1 нумерация остатков перечислена при использовании схем нумерации Кэбата и Чотиа. FR-области расположены между CDR-областями, например, FR-L1 расположена перед CDR-L1, FR-L2 расположена между CDR-L1 и CDR-L2, FR-L3 расположена между CDR-L2 и CDR-L3, и т.д. Следует отметить, что, поскольку в показанной нумерации Кэбата вставки помещены в положения H35A и H35B, конец петли CDR-H1 Чотиа при нумерации с использованием показанной системы нумерации Кэбата варьирует между H32 и H34, в зависимости от длины петли.

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

CDR	Кэбат	Чотиа	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 Кэбата ¹)	H31-H35B	H26-H32..34	H26-H35B	H30-H35B
CDR-H1 (нумерация Чотиа ²)	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

[0307] Таким образом, если не определено иное, следует понимать, что "CDR" или "определяющая комплементарность область" или отдельные указанные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) данного антитела или его области, такой как переменная область, охватывают некоторую (или конкретную) определяющую комплементарность область, определенную согласно любой из вышеуказанных схем или других известных схем. Например, если указано, что конкретная CDR-область (например, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в данной аминокислотной последовательности V_H или V_L-области, подразумевается, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (например, CDR-H3) в переменной области, как определено согласно любой из вышеуказанных схем или других известных схем. В некоторых вариантах осуществления указаны конкретные CDR-последовательности. Примерные CDR-последовательности антител описаны при использовании различных схем нумерации, хотя подразумевается, что антитело может включать CDR-области, описанные согласно любой из других вышеуказанных схем нумерации или других схем нумерации, известных специалисту в данной области.

[0308] Аналогичным образом, если не определено иное, следует понимать, FR или отдельная определенная FR-область(и) (например, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4) данного антитела или его области, такой как переменная область, охватывает некоторую (или определенную) каркасную область, определенную согласно любой из известных схем. В некоторых случаях схему идентификации конкретной CDR, FR, или FR-областей или CDR-областей указывают, например, CDR, как определено согласно методу Кэбата, Чотиа, AbM или Контактному методу, или другими известными схемам. В других случаях приведена конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

[0309] Термин "переменная область" или "переменный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Переменные области тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L, соответственно) нативного антитела обычно имеют сходные структуры, причем каждый домен включает четыре консервативные каркасные области (FR) и три CDR (см., например, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., стр. 91 (2007)). Одного V_H или V_L домена может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, связывающие конкретный антиген, могут быть выделены с помощью V_H или V_L домена из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки

комплементарных V_L или V_H доменов, соответственно. См., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

[0310] Антитела, включенные в CAR-рецепторы, включают фрагменты антител. "Фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая включает часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения перечисленными, F_v , Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; диатела; линейные антитела; переменные области тяжелой цепи (V_H), одноцепочечные молекулы антител, такие как scFv и однодоменные антитела, включающие только V_H область; и мультиспецифичные антитела, сформированные из фрагментов антител. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен в CAR-рецепторах представляет собой или включает фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H) и переменную область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие переменную (V_H) область тяжелой цепи и/или переменную (V_L) область легкой цепи, такую как scFv.

[0311] Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, включающие весь или часть переменного домена тяжелой цепи или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело является человеческим однодоменным антителом. В некоторых вариантах осуществления изобретения CAR включает домен тяжелой цепи антитела, который специфично связывает антиген, такой как онкомаркер или антиген клеточной поверхности клетки или заболевания, которые являются мишенью, такие как опухолевая клетка или раковая клетка, такая как любой из антигенов-мишеней, описанных в настоящем описании или известных.

[0312] Фрагменты антител могут быть получены различными способами, в том числе, без ограничения этим, путем протеолитического расщепления интактного антитела, а также в результате продукции рекомбинантными клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой рекомбинантно полученные фрагменты, такие как фрагменты, содержащие конфигурации, которые не встречаются в природе, такие как фрагменты с двумя или более областями или цепями антител, соединенными синтетическими линкерами, например пептидными линкерами, и/или которые не могут быть получены путем ферментного расщепления природного интактного антитела. В некоторых вариантах осуществления фрагменты антител представляют собой scFv-фрагменты.

[0313] "Гуманизированное" антитело является антителом, в котором все или по существу все аминокислотные остатки CDR получены из нечеловеческих CDR, и все или по существу все аминокислотные остатки FR получены из человеческих FR. Гуманизированное антитело необязательно может включать по меньшей мере часть константной области антитела, полученной из человеческого антитела.

"Гуманизированная форма" нечеловеческого антитела относится к варианту нечеловеческого антитела, который подвергся гуманизации, обычно для снижения иммуногенности у человека, с сохранением специфичности и аффинности исходного нечеловеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками из нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого получены остатки CDR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

[0314] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть экспрессируется на клетках как часть рекомбинантного рецептора, такого как антигенный рецептор. Антигенные рецепторы включают функциональные не-TCR антигенные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR-рецепторы). Как правило, CAR, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который демонстрирует TCR-подобную специфичность, направленную против комплексов пептид-МНС, также может называться TCR-подобным CAR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный к комплексу МНС-пептид TCR-подобного CAR, связан с одним или более внутриклеточными сигнальными компонентами, в некоторых аспектах через линкеры и/или трансмембранный домен(ы). В некоторых вариантах осуществления такие молекулы обычно могут имитировать или приблизительно воспроизводить сигнал через природный антигенный рецептор, такой как TCR, и, необязательно, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором.

[0315] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор (например, CAR), включает лигандсвязывающий домен, который связывается, например, специфично связывается, с антигеном (или лигандом). Антигены, которые являются мишенями химерных рецепторов, включают антигены, экспрессируемые в контексте заболевания, состояния или типа клеток, которые должны служить в качестве мишеней адоптивной клеточной терапии. Заболевания и состояния включают пролиферативные, неопластические и злокачественные заболевания и нарушения, включая рак и опухоли, в том числе гемобластные раковые опухоли, раковые опухоли иммунной системы, такие как лимфомы, лейкозы и/или миеломы, такие как В, Т и миелоидные лейкозы, лимфомы и множественные миеломы.

[0316] В некоторых вариантах осуществления антиген (или лиганд) является полипептидом. В некоторых вариантах осуществления он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления антиген (или лиганд) селективно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках заболевания или состояния, например, опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на модифицированных клетках.

[0317] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело или

антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), который специфично распознает антиген, такой как интактный антиген, экспрессируемый на поверхности клетки.

[0318] В некоторых вариантах осуществления антиген (или лиганд) является опухолевым антигеном или онкомаркером. В некоторых вариантах осуществления антиген (или лиганд) представляет собой или включает интегрин $\alpha\beta 6$ (интегрин $\alpha\text{v}\beta 6$), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, раковый/тестикулярный антиген 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), раково-эмбриональный антиген (РЭА), циклин, циклин A2, хемокиновый лиганд с C-C-мотивом 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), мутантный рецептор эпидермального фактора роста III типа (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфринB2, рецептор эфрина A2 (EPHa2), эстрогеновый рецептор, Fc-рецептор-подобный 5 (FCRL5; также известный как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), эмбриональный рецептор ацетилхолина (фетальный AchR), фолатсвязывающий белок (FBP), альфа-рецептор фолата, ганглиозид GD2, О-ацетилованный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), член D группы 5 G-белок-сопряженных рецепторов класса C (GPRC5D), Her2/neu (рецепторную тирозинкиназу erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, человеческий высокомолекулярный меланома-ассоциированный антиген (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита В, человеческий лейкоцитарный антиген A1 (HLA-A1), человеческий лейкоцитарный антиген A2 (HLA-A2), альфа-рецептор IL-22 (IL-22R α), альфа-рецептор IL-13 2 (IL-13R $\alpha 2$), рецептор с доменом вставки киназы (kdr), легкую цепь каппа, молекулу клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитоп L1-CAM, член A семейства содержащих богатые лейцином повторы белков 8 (LRRC8A), Льюис Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), c-Met, цитомегаловирус мышей (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды члена D группы 2 рецепторов NK-клеток (NKG2D), мелан А (MART-1), невральная молекула клеточной адгезии (NCAM), онкофетальный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простатический специфический антиген, простатический антиген стволовых клеток (PSCA), простатический специфический мембранный антиген (PSMA), подобный рецепторной тирозинкиназе орфанный рецептор 1 (ROR1), сурвивин, трофобластический гликопротеин (TPBG, также известный как 5T4), опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), тирозиназа-связанный белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), тирозиназа-связанный белок 2 (TRP2, также известный как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белок опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или патоген-экспрессируемый антиген или антиген, ассоциированный с универсальной

меткой, и/или биотинилированные молекулы и/или молекулы, экспрессируемые ВИЧ, ВГС, ВГВ или другими патогенами. Антигены, являвшиеся мишенью рецепторов, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любые из известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой или включает CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

[0319] В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR против BCMA, который является специфичным к BCMA, например, BCMA человека. Химерные антигенные рецепторы, содержащие антитела против BCMA, включающие мышинные антитела против BCMA человека и антитела против иммуноглобулинов человека, и клетки, экспрессирующие такие химерные рецепторы, были описаны ранее. См. Carpenter et al., Clin Cancer Res., 2013, 19(8):2048-2060, WO 2016/090320, WO2016/090327, WO2010104949A2 и WO2017173256. В некоторых вариантах осуществления CAR против BCMA содержит антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержащий вариабельную область тяжелой (V_H) и/или вариабельную область легкой (V_L) цепи, полученную из антитела, описанного в WO 2016/090320 или WO2016090327. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , представленный в SEQ ID NO: 30, и V_L , представленный в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , представленный в SEQ ID NO: 32, и V_L , представленный в SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , представленный в SEQ ID NO: 34, и V_L , представленный в SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , представленный в SEQ ID NO: 27, и V_L , представленный в SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , представленный в SEQ ID NO: 41, и V_L , представленный в SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , представленный в SEQ ID NO: 43, и V_L , представленный в SEQ ID NO: 44.

[0320] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , представленную в SEQ ID NO: 45 и V_L , представленную в SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, V_H или V_L имеет аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с любой из предыдущих последовательностей V_H или V_L и сохраняет связывание с BCMA. В некоторых вариантах осуществления V_H область является N-концевой по отношению к V_L области. В некоторых вариантах осуществления V_H область является C-концевой по отношению к V_L области.

[0321] В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR против CD19, который является специфичным в отношении CD19, например, CD19

человека. В некоторых вариантах осуществления антигеном является CD19. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит V_H и V_L , полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD19. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, который связывает CD19, является мышинным антителом, таким как FMC63 и SJ25C1. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела является человеческим антителом, например, как описано в патентной публикации США 2016/0152723.

[0322] В некоторых вариантах осуществления scFv получен из FMC63. FMC63 в общем относится к моноклональному мышинному IgG1 антителу, индуцированному против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., et al. (1987). *Leucocyte typing III*. 302). В некоторых вариантах осуществления антитело FMC63 включает CDR-H1 и CDR-H2, представленные в SEQ ID NO: 50, 51, соответственно, и CDR-H3, представленную в SEQ ID NO: 52 ил 66, и CDR-L1, представленную в SEQ ID NO: 47, и CDR-L2, представленную в SEQ ID NO: 48 или 67, и CDR-L3, представленную в SEQ ID NO: 49 или 68. В некоторых вариантах осуществления антитело FMC63 включает переменную область тяжелой цепи (V_H), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и переменную область легкой цепи (V_L), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54.

[0323] В некоторых вариантах осуществления scFv включает переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDR-L1 SEQ ID NO:47, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO:48 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO:49, и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR-H1 SEQ ID NO:50, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO:51 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO:52. В некоторых вариантах осуществления scFv включает переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO:53, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO:54. В некоторых вариантах осуществления переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер представлен в SEQ ID NO:70. В некоторых вариантах осуществления scFv включает, в указанном порядке, V_H , линкер и V_L . В некоторых вариантах осуществления scFv включает, в указанном порядке, V_L , линкер и V_H . В некоторых вариантах осуществления scFv кодируется последовательностью нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO:69, или последовательностью, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:69. В некоторых вариантах осуществления scFv включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:55, или последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:55.

[0324] В некоторых вариантах осуществления scFv получен из SJ25C1. SJ25C1 является моноклональным мышинным IgG1 антителом, индуцированным против клеток

Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., et al. (1987). Leucocyte typing III. 302). В некоторых вариантах осуществления антитело SJ25C1 включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO: 59-61, соответственно, и последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 56-58, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело SJ25C1 включает переменную область тяжелой цепи (V_H), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и переменную область легкой цепи (V_L), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

[0325] В некоторых вариантах осуществления scFv включает переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDR-L1 SEQ ID NO:56, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO: 57 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO:58, и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR-H1 SEQ ID NO:59, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO:60 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO:61. В некоторых вариантах осуществления scFv включает переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO:62, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO:63. В некоторых вариантах осуществления переменная тяжелая и переменная легкая цепь соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер представлен в SEQ ID NO:64. В некоторых вариантах осуществления scFv включает, в указанном порядке, V_H , линкер и V_L . В некоторых вариантах осуществления scFv включает, в указанном порядке, V_L , линкер и V_H . В некоторых вариантах осуществления scFv включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:65, или последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности SEQ ID NO:65.

[0326] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой CD20. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит V_H и V_L , полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD20. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, который связывает CD20, является антителом, которое представляет собой или получено из Ритуксимаба, такого как scFv Ритуксимаба.

[0327] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой CD22. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит V_H и V_L , полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD22. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, который связывает CD22, является антителом, которое представляет собой или получено из m971, такого как scFv m971.

[0328] В некоторых вариантах осуществления антиген или антигенсвязывающий домен представляет собой GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит V_H и V_L , полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, который связывает GPRC5D, представляет собой или содержит V_H и V_L из антитела или фрагмента антитела, представленного в публикациях Международных заявок WO

2016/090329 и WO 2016/090312.

[0329] В некоторых вариантах осуществления антитело является антигенсвязывающим фрагментом, таким как scFv, включающий один или более линкеров, соединяющих два домена или области антитела, такие как переменную область тяжелой цепи (V_H) и переменную область легкой цепи (V_L). Линкер, как правило, является пептидным линкером, например, гибким и/или растворимым пептидным линкером. Линкеры включают линкеры, богатые глицином и серином и/или, в некоторых случаях, треонином. В некоторых вариантах осуществления линкеры дополнительно включают заряженные остатки, такие как лизин и/или глутамат, что может улучшать растворимость. В некоторых вариантах осуществления линкеры дополнительно включают один или более пролинов. В некоторых аспектах линкеры, богатые глицином и серином (и/или треонином), включают по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% такой аминокислоты (аминокислот). В некоторых вариантах осуществления они включают по меньшей мере от или от приблизительно 50%, 55%, 60%, 70% или 75% глицина, серина и/или треонина. В некоторых вариантах осуществления линкер по существу полностью состоит из глицина, серина и/или треонина. Линкеры обычно имеют длину приблизительно от 5 до приблизительно 50 аминокислот, как правило, от или от приблизительно 10 и до или до приблизительно 30, например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 и, в некоторых примерах, имеют длину от 10 до 25 аминокислот. Примерные линкеры включают линкеры, содержащие разное число повторов последовательности GGGGS (4GS; SEQ ID NO:36) или GGGS (3G; SEQ ID NO:37), такое как от 2, 3, 4 и до 5 повторов такой последовательности. Примерные линкеры включают линкеры, которые содержат или состоят из последовательности, представленной в SEQ ID NO:38 (GGGGSGGGSGGGGS), SEQ ID NO:39 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG) или SEQ ID NO: 40 (SRGGGGSGGGSGGGGSLEMA).

[0330] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой или включает патоген-специфический или патоген-экспрессируемый антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген является вирусным антигеном (таким как вирусный антиген из ВИЧ, ВГС, ВГВ и т.д.), бактериальными антигенами и/или паразитарными антигенами. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит TCR-подобное антитело, такое как антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), который специфично распознает внутриклеточный антиген, такой как опухолеассоциированный антиген, презентируемый на поверхности клеток в виде МНС-пептидного комплекса. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, которая распознает этот МНС-пептидный комплекс, может экспрессироваться на клетках в качестве части рекомбинантного рецептора, такого как антигенный рецептор. Антигенные рецепторы являются функциональными не-TCR антигенными рецепторами, такими как химерные антигенные рецепторы (CAR). Обычно CAR, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который демонстрирует

TCR-подобную специфичность, направленную против комплексов пептид-МНС, также может именоваться TCR-подобным CAR.

[0331] Ссылка на "Главный комплекс гистосовместимости" (МНС) относится к белку, обычно гликопротеину, который содержит полиморфный пептидсвязывающий сайт или полость связывания, которая, в некоторых случаях, может образовывать комплекс с пептидными антигенами полипептидов, включая пептидные антигены, процессированные аппаратом клетки. В некоторых случаях молекулы МНС могут экспонироваться или экспрессироваться на поверхности клетки, в том числе в виде комплекса с пептидом, т.е. комплекса МНС-пептид, для презентирования антигена в конформации, распознаваемой антигенным рецептором на Т-клетках, таким как TCR-рецепторы или TCR-подобное антитело. Обычно молекулы МНС класса I являются гетеродимерами, имеющими трансмембранную α -цепь, в некоторых случаях с тремя α -доменами, и нековалентно связанный β 2-микроглобулин. Как правило, молекулы МНС класса II состоят из двух трансмембранных гликопротеинов, α и β , которые обычно проходят через мембрану. Молекула МНС может включать эффективную часть МНС, которая содержит антигенсвязывающий сайт или сайты связывания пептида и последовательности, необходимые для распознавания соответствующим антигенным рецептором. В некоторых вариантах осуществления молекулы МНС класса I доставляют пептиды, образующиеся в цитозоле, на поверхность клетки, где комплекс МНС-пептид распознается Т-клетками, обычно такими как $CD8^+$ Т-клетки, но в некоторых случаях $CD4^+$ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления молекулы МНС класса II доставляют пептиды, образующиеся в везикулярной системе, на поверхность клетки, где они обычно распознаются $CD4^+$ Т-клетками. Как правило, молекулы МНС кодируются группой связанных локусов, которые в совокупности называются H-2 у мышей и человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA) у человека. Следовательно, обычно человеческий МНС также может называться человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA).

[0332] Термин "МНС-пептидный комплекс" или "комплекс пептида-МНС", или соответствующие вариации, относится к комплексу или ассоциации пептидного антигена и молекулы МНС, такой как, обычно, в результате нековалентных взаимодействий пептида в связывающей полости или впадине молекулы МНС. В некоторых вариантах осуществления комплекс МНС-пептида присутствует или экспонирован на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления комплекс МНС-пептида может специфично распознаваться антигенным рецептором, таким как TCR, TCR-подобный CAR или их антигенсвязывающие части.

[0333] В некоторых вариантах осуществления пептид, такой как пептидный антиген или эпитоп, полипептида может ассоциировать с молекулой МНС, например, для распознавания антигенным рецептором. Как правило, пептид получен из или основан на фрагменте более длинной биологической молекулы, такой как полипептид или белок. В некоторых вариантах осуществления пептид обычно имеет длину от приблизительно 8 до приблизительно 24 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид имеет

длину от или от приблизительно 9 до 22 аминокислот для распознавания в комплексе МНС класса II. В некоторых вариантах осуществления пептид имеет длину от или от приблизительно 8 до 13 аминокислот для распознавания в комплексе МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления после распознавания пептида в контексте молекулы МНС, такой как МНС-пептидный комплекс, антигенный рецептор, такой как TCR или TCR-подобный CAR, генерирует или инициирует сигнал активации Т-клетки, который индуцирует Т-клеточный ответ, такой как пролиферацию Т-клеток, продукцию цитокинов, цитотоксический Т-клеточный ответ или другой ответ.

[0334] В некоторых вариантах осуществления TCR-подобное антитело или антигенсвязывающая часть известны или могут быть получены известными методами (см., например, опубликованные заявки на патент США US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US20090226474; US20090304679; и публикацию Международной заявки PCT WO 03/068201).

[0335] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфично связываются с МНС-пептидным комплексом, могут быть получены путем иммунизации хозяина эффективным количеством иммуногена, содержащего определенный комплекс МНС-пептида. В некоторых случаях пептид МНС-пептидного комплекса является эпитопом антигена, способного связываться с МНС, такого как опухолевый антиген, например, универсальный опухолевый антиген, миеломный антиген или другой антиген, как описано ниже. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество иммуногена затем вводят хозяину, чтобы вызвать иммунный ответ, где иммуноген сохраняет свою трехмерную форму в течение периода времени, достаточного, чтобы вызвать иммунный ответ против трехмерной презентации пептида в связывающей полости молекулы МНС. Затем сыворотку, собранную у хозяина, исследуют для определения, вырабатываются ли требуемые антитела, которые распознают трехмерную презентацию пептида в полости связывания молекулы МНС. В некоторых вариантах осуществления полученные антитела могут оценивать для подтверждения того, что антитело может отличать МНС-пептидный комплекс от одной молекулы МНС, одного представляющего интерес пептида и комплекса МНС и нерелевантного пептида. Затем нужные антитела могут быть выделены.

[0336] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфично связываются с МНС-пептидным комплексом, могут быть получены при использовании методов библиотек дисплея антител, таких как фаговые библиотеки антител. В некоторых вариантах осуществления могут быть получены библиотеки фагового дисплея мутантных Fab, scFv или других форм антител, например, в которых члены библиотеки содержат мутацию по одному или более остаткам в одной или нескольких CDR. См., например, опубликованные заявки на патент США US20020150914, US2014/0294841; и Cohen CJ. et al. (2003) J Mol. Recogn. 16:324-332.

[0337] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления химерный

антигенный рецептор, в том числе TCR-подобные CAR-рецепторы, включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент включает scFv. В некоторых аспектах химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, и внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

[0338] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, такой как CAR, такой как его часть антитела, дополнительно включает спейсер, который может быть или может включать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина или его вариант или модифицированную версию, такую как шарнирная область, например, шарнирная область IgG4, и/или Fc и/или C_H1/C_L область. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор дополнительно включает спейсер и/или шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления константная область или часть происходит из человеческого IgG, такого как IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах часть константной области служит в качестве спейсерной области между антигенраспознающим компонентом, например scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, которая обеспечивает увеличенную реактивность клетки после связывания антигена по сравнению с отсутствием спейсера.

[0339] В некоторых примерах спейсер имеет длину от или от приблизительно 12 аминокислот или не больше 12 аминокислот. Примерные спейсеры включают такие, которые содержат по меньшей мере приблизительно 10-229 аминокислот, приблизительно 10-200 аминокислот, приблизительно 10-175 аминокислот, приблизительно 10-150 аминокислот, приблизительно 10-125 аминокислот, приблизительно 10-100 аминокислот, приблизительно 10-75 аминокислот, приблизительно 10-50 аминокислот, приблизительно 10-40 аминокислот, приблизительно 10-30 аминокислот, приблизительно 10-20 аминокислот или приблизительно 10-15 аминокислот, и включая любое целое число между границами любого из перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления область спейсера содержит приблизительно 12 аминокислот или меньше, приблизительно 119 аминокислот или меньше или приблизительно 229 аминокислот или меньше. Примерные спейсеры включают только шарнир IgG4, шарнир IgG4, связанный с C_H2 и C_H3 доменами, или шарнир IgG4, связанный с C_H3 доменом. Примерные спейсеры включают, без ограничения перечисленными, спейсеры, описанные в публикациях Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, Hudecek et al. (2015) Cancer Immunol Res. 3(2): 125-135 или публикацию международной заявки WO2014031687, патент США 8,822,647 или опубликованную заявку US2014/0271635. В некоторых вариантах

осуществления спейсер включает последовательность шарнирной области иммуноглобулина, C_H2 и C_H3 область. В некоторых вариантах осуществления одно или более из шарнира, C_H2 и C_H3 получены, все или частично, из IgG4 или IgG2. В некоторых случаях шарнир, C_H2 и C_H3 получены из IgG4. В некоторых аспектах одно или более из шарнира, C_H2 и C_H3 являются химерными и содержат последовательность, полученную из IgG4 и IgG2. В некоторых примерах спейсер содержит химерный шарнир IgG4/2, C_H2 область IgG2/4 и C_H3 область IgG4.

[0340] В некоторых вариантах осуществления спейсер может быть получен, полностью или частично, из IgG4 и/или IgG2 и может содержать мутации, такие как одну или более одиночных аминокислотных мутаций в одном или более доменах. В некоторых примерах аминокислотная модификация является заменой пролина (P) на серин (S) в шарнирной области IgG4. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная модификация является заменой глутамин (Q) на аспарагин (N) для уменьшения гетерогенности гликозилирования, такой как мутация N177Q в положении 177, в C_H2 области полноразмерной последовательности Fc IgG4, или N176Q в положении 176, в C_H2 области полноразмерной последовательности Fc IgG4.

[0341] В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 и кодируемую последовательностью, представленной в SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления кодируемый спейсер представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления константная область или часть происходит из IgD. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 или 29.

[0342] Антигенраспознающий домен обычно соединен с одним или более внутриклеточными сигнальными компонентами, такими как сигнальные компоненты, которые имитируют активацию через комплекс антигенного рецептора, такой как комплекс TCR, в случае CAR, и/или сигнал через другой рецептор клеточной поверхности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий компонент (например, антитело) соединен с одной или более трансмембранными и внутриклеточными сигнальными областями. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен слит с внеклеточным доменом. В одном варианте осуществления используется трансмембранный домен, который обычно связан с одним из доменов в рецепторе, например, CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбран или изменен путем аминокислотной замены так, чтобы предотвратить связывание таких

доменов с трансмембранными доменами одинаковых или разных поверхностных мембранных белков, чтобы свести к минимуму взаимодействия с другими членами комплекса рецептора.

[0343] Трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления получен из природного или из синтетического источника. Когда источник является природным, домен в некоторых аспектах получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, полученные из (т.е. включают, по меньшей мере, трансмембранную область(и)) альфа, бета или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В альтернативе трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления является синтетическим. В некоторых аспектах синтетический трансмембранный домен включает преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах триплет фенилаланина, триптофана и валина будет присутствовать на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления связь осуществляется посредством линкеров, спейсеров и/или трансмембранного домена(ов).

[0344] Внутриклеточные сигнальные области включают те, которые имитируют или приближенно воспроизводят сигнал через природный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в сочетании с костимулирующим рецептором и/или сигнал только через один костимулирующий рецептор. В некоторых вариантах осуществления короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий глицины и серины, например, глицин-сериновый дуплет, присутствует и образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

[0345] Рецептор, например CAR, обычно включает по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты. В некоторых вариантах осуществления рецептор включает внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как цепь CD3 TCR, которая опосредует активацию и цитотоксичность Т-клеток, например, дзета-цепь CD3. Таким образом, в некоторых аспектах ROR1-связывающее антитело соединено 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 CD трансмембранные домены. В некоторых вариантах осуществления рецептор, например CAR, дополнительно включает часть одной или более дополнительных молекул, таких как Fc-рецептор γ , CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах, CAR включает химерную молекулу между CD3-дзета (CD3- ζ) или Fc-рецептором γ и CD8, CD4, CD25 или CD16.

[0346] В некоторых вариантах осуществления при связывании CAR, цитоплазматический домен или внутриклеточная сигнальная область CAR активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций или ответы иммунной клетки, например, Т-клетки, модифицированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых

контекстах CAR индуцирует функцию Т-клеток, такую как цитолитическую активность или активность Т-хелперов, такую как секреция цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления усеченная часть внутриклеточной сигнальной области компонента антигенного рецептора или костимулирующая молекула используется вместо интактной иммуностимуляторной цепи, например, если она преобразует сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточные сигнальные области, например, включающие внутриклеточный домен или домены, включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), и в некоторых аспектах также последовательности корецепторов, которые в естественном контексте действуют совместно с таким рецептором, иницируя сигнальную трансдукцию после связывания с антигенным рецептором, и/или любое производное или вариант таких молекул и/или любую синтетическую последовательность, которая обладает такой же функциональной способностью.

[0347] В контексте природного TCR полная активация обычно требует не только сигнализации через TCR, но также и костимулирующего сигнала. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, чтобы вызвать полную активацию, компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала также включают в CAR. В других вариантах осуществления CAR не включает компонент для генерации костимулирующего сигнала. В некоторых аспектах дополнительный CAR экспрессируется в той же клетке и обеспечивает компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала.

[0348] Активация Т-клеток в некоторых аспектах описывают как опосредованную двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: последовательности, которые иницируют антигензависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и последовательности, которые действуют по антигеннезависимому пути, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). В некоторых аспектах CAR включает один или оба таких сигнальных компонента.

[0349] В некоторых аспектах CAR включает первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует первичную активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, действующие стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторный тирозиновый активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM, содержащего первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают ITAM, полученные из TCR или дзета-цепи CD3, FcR-гамма или FcR-бета. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматическая сигнальная молекула(ы) в CAR содержит цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, полученную из CD3-дзета.

[0350] В некоторых вариантах осуществления CAR включает сигнальную область и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такого как CD28, 4-1BB,

OX40, DAP10 и ICOS. В некоторых аспектах тот же CAR включает сигнальную область и костимулирующие компоненты.

[0351] В некоторых вариантах осуществления сигнальную область включают в один CAR, тогда как костимулирующий компонент предоставляет другой CAR, распознающий другой антиген. В некоторых вариантах осуществления CAR-рецепторы включают активирующие или стимулирующие CAR-рецепторы и костимулирующие CAR-рецепторы, которые экспрессируются на одной клетке (см. WO2014/055668).

[0352] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область включает трансмембранный и сигнальный домен CD28, соединенный с внутриклеточным доменом CD3 (например, CD3-дзета). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область включает химерные костимулирующие домены CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9), соединенные с внутриклеточным доменом CD3-дзета.

[0353] В некоторых вариантах осуществления CAR включает один или более, например два или больше, костимулирующих доменов и активирующий домен, например первичный активирующий домен, в цитоплазматической части. Примерные CAR-рецепторы включают внутриклеточные компоненты CD3-дзета, CD28 и 4-1BB.

[0354] В некоторых случаях CAR-рецепторы именуются CAR-рецепторами первого, второго и/или третьего поколения. В некоторых аспектах CAR первого поколения является рецептором, который при связывании антигена дает только сигнал, индуцированный цепью CD3; в некоторых аспектах CAR второго поколения является рецептором, который дает такой сигнал и костимулирующий сигнал, такой как CAR, включающий внутриклеточный сигнальный домен из костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах, CAR третьего поколения в некоторых аспектах является рецептором, включающим множество костимулирующих доменов разных костимулирующих рецепторов.

[0355] В некоторых вариантах осуществления рецептор химерного антигена включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, описанный в настоящем описании. В некоторых аспектах химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, описанный в настоящем описании, и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент включает scFv или однодоменное V_H-антитело, а внутриклеточный домен содержит ITAM. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен включает сигнальный домен дзета-цепи CD3-дзета (CD3 ζ) цепи. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор включает трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

[0356] В некоторых аспектах трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. Внеклеточный домен и трансмембранный могут быть соединены напрямую или непрямо. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен и трансмембранный соединены спейсером, таким как любой описанный в настоящем

описании. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен Т-клеточной костимулирующей молекулы, например, между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых аспектах Т-клеточной костимулирующей молекулой является CD28 или 4-1BB.

[0357] В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть CD28 или ее функциональный вариант и сигнальную часть CD3-дзета или ее функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть 4-1BB или ее функциональный вариант и сигнальную часть CD3-дзета или ее функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления рецептор дополнительно включает спейсер, содержащий часть молекулы Ig, такой как молекула Ig человека, такую как шарнир Ig, например, шарнир IgG4, такой как спейсер только из шарнира.

[0358] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен рецептора, например CAR, является трансмембранным доменом человеческого CD28 или его вариантом, например, трансмембранным доменом из 27 аминокислот человеческого CD28 (рег. номер: P10747.1) или трансмембранным доменом, включающим последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO:8; в некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен, содержащий часть рекомбинантного рецептора, включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, обладающую по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большей идентичностью последовательности с ней.

[0359] В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен Т-клеточной костимулирующей молекулы. В некоторых аспектах Т-клеточной костимулирующей молекулой является CD28 или 4-1BB.

[0360] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область включает внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен человеческого CD28 или его функциональный вариант или его часть, такой как домен из его 41 аминокислоты и/или такой как домен с заменой LL на CC в положениях 186-187 нативного белка CD28. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен может включать последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 10 или 11, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная область включает внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB или функциональный вариант или его часть, такой как цитоплазматический домен из 42 аминокислот 4-1BB человека (например, рег. номер Q07011.1) или его функциональный вариант или его часть, такую как последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 12, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

[0361] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область включает цепь CD3 человека, необязательно стимулирующий сигнальный домен CD3-дзета или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 CD3 ζ человека (рег. номер P20963.2) или сигнальный домен CD3-дзета, как описано в патенте США 7,446,190 или патенте США 8,911,993. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13, 14 или 15.

[0362] В некоторых аспектах спейсер содержит только шарнирную область IgG, такую как только шарнир IgG4 или IgG1, такой как спейсер только из шарнира, представленный в SEQ ID NO:1. в других вариантах осуществления спейсер представляет шарнир Ig, например, IgG4 шарнир, соединенный с C_H2 и/или C_H3 доменами. В некоторых вариантах осуществления спейсер является шарниром Ig, например, шарниром IgG4, связанным с C_H2 и C_H3 доменами, таким как представлено в SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления спейсер является шарниром Ig, например, шарниром IgG4, связанным только с доменом C_H3, таким как представлено в SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой или включает богатую глицин-серином последовательность или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры.

2. Т-клеточные рецепторы (TCR)

[0363] В некоторых вариантах осуществления модифицированные клетки, такие как Т-клетки, представляют собой клетки, которые экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающая часть, которая распознает эпитоп пептида или эпитоп Т-клеток полипептида-мишени, такой как антиген опухоли, вирусный или аутоиммунный белок.

[0364] В некоторых вариантах осуществления "Т-клеточный рецептор" или "TCR" представляет собой молекулу, содержащую переменные α и β -цепи (также известные как TCR α и TCR β , соответственно) или переменные γ и δ -цепи (также известные как TCR α и TCR β , соответственно), или их антигенсвязывающие части, и которая способна

специфично связываться с пептидом, связанным с молекулой МНС. В некоторых вариантах осуществления TCR находится в $\alpha\beta$ форме. Как правило, TCR-рецепторы, которые существуют в $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ формах, в целом являются структурно подобными, но Т-клетки, экспрессирующие их, могут иметь разную анатомическую локализацию или функции. TCR может присутствовать на поверхности клетки или в растворимой форме. Обычно TCR присутствует на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он обычно отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС).

[0365] Если не указано иное, следует понимать, что термин "TCR" охватывает полноразмерные TCR-рецепторы, а также его антигенсвязывающие части или антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления TCR является интактным или полноразмерным TCR, включая TCR-рецепторы в $\alpha\beta$ -форме или $\gamma\delta$ -форме. В некоторых вариантах осуществления TCR является антигенсвязывающей частью, которая меньше полноразмерного TCR, но которая связывается с определенным пептидом, связанным на молекуле МНС, то есть связывается с комплексом МНС-пептида. В некоторых случаях антигенсвязывающая часть или фрагмент TCR могут содержать только часть структурных доменов полноразмерного или интактного TCR, но при этом может связывать эпитоп пептида, такой как комплекс МНС-пептида, с которым связывается полный TCR. В некоторых случаях антигенсвязывающая часть содержит переменные домены TCR, такие как переменную α цепь и переменную β цепь TCR, достаточную для формирования связывающего участка для связывания со специфическим комплексом МНС-пептида. Обычно переменные цепи TCR содержат определяющие комплементарность области, участвующие в распознавании пептида, МНС и/или комплекса МНС-пептида.

[0366] В некоторых вариантах осуществления переменные домены TCR содержат гиперпеременные петли или определяющие комплементарность области (CDR-области), которые обычно вносят основной вклад в способность и специфичность распознавания и связывания антигена. В некоторых вариантах осуществления CDR TCR-рецептора или их комбинация формирует весь или по существу весь антигенсвязывающий сайт данной молекулы TCR. Различные CDR-области в переменной области цепи TCR обычно разделены каркасными областями (FR-областями), которые обычно демонстрируют меньшую переменность среди молекул TCR по сравнению с CDR-областями (см., например, Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988; также см. Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). В некоторых вариантах осуществления CDR3 является основной CDR-областью, ответственной за связывание или специфичность антигена, или является наиболее важной из трех CDR в данной переменной области TCR для распознавания антигена и/или для взаимодействия с процессированной пептидной частью комплекса пептид-МНС. В некоторых контекстах CDR1 альфа-цепи может взаимодействовать с N-концевой частью некоторых антигенных пептидов. В некоторых контекстах CDR1 бета-цепи может взаимодействовать с С-

концевой частью пептида. В некоторых контекстах CDR2 вносит наибольший вклад или является основной CDR-областью, ответственной за взаимодействие или распознавание части МНС комплекса МНС-пептид. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область β -цепи может содержать дополнительную гипервариабельную область (CDR4 или HVR4), которая обычно участвует в связывании суперантигенов, а не в распознавании антигенов (Kotb (1995) *Clinical Microbiology Reviews*, 8:411-426).

[0367] В некоторых вариантах осуществления TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический хвост (см., например, Janeway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). В некоторых аспектах каждая цепь TCR может иметь один N-концевой вариабельный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост на C-конце. В некоторых вариантах осуществления TCR связан с инвариантными белками комплекса CD3, участвующего в опосредовании сигнальной трансдукции.

[0368] В некоторых вариантах осуществления цепь TCR содержит один или более константных доменов. Например, внеклеточная часть данной цепи TCR (например, α -цепь или β -цепь) может содержать два иммуноглобулиноподобных домена, таких как вариабельный домен (например, $V\alpha$ или $V\beta$; обычно аминокислоты 1-116 на основе нумерации Кэбата в Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.) и константный домен (например, константный домен α -цепи или $C\alpha$, как правило, положения 117-259 цепи согласно нумерации Кэбата, или константный домен β -цепи или $C\beta$, как правило, положения 117-295 цепи согласно нумерации Кэбата), примыкающий к клеточной мембране. Например, в некоторых случаях внеклеточная часть TCR, образованная двумя цепями, содержит два проксимальных по отношению к мембране константных домена и два дистальных по отношению к мембране вариабельных домена, каждый из которых содержит CDR-области. Константный домен TCR может содержать короткие соединительные последовательности, в которых остаток цистеина образует дисульфидную связь, связывающую, таким образом, две цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR может содержать дополнительный остаток цистеина в каждой из α и β -цепей, в результате TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

[0369] В некоторых вариантах осуществления цепи TCR содержат трансмембранный домен. В некоторых вариантах трансмембранный домен является положительно заряженным. В некоторых случаях цепь TCR содержит цитоплазматический хвост. В некоторых случаях структура позволяет TCR связываться с другими молекулами, такими как CD3 и их субъединицы. Например, TCR, содержащий константные домены с трансмембранной областью, может закреплять белок в клеточной мембране и связываться с инвариантными субъединицами сигнального аппарата или комплекса CD3. Внутриклеточные хвосты сигнальных субъединиц CD3 (например, цепи

CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 ζ) содержат один или более иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов или ITAM, которые участвуют в сигнальной способности комплекса TCR.

[0370] В некоторых вариантах осуществления TCR может быть гетеродимером двух цепей α и β (или необязательно γ и δ), или он может быть одноцепочечной конструкцией TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR является гетеродимером, содержащим две отдельные цепи (α и β цепи или γ и δ цепи), которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями.

[0371] В некоторых вариантах осуществления TCR может быть получен из известной последовательности(ей) TCR, такой как последовательности V α , β -цепей, для которых легко доступна по существу полноразмерная кодирующая последовательность. Способы получения полноразмерных последовательностей TCR, включая последовательности V-цепей, из клеточных источников известны. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, могут быть получены из множества источников, например, при амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) TCR-кодирующих нуклеиновых кислот, содержащихся или выделенных из данной клетки или клеток, или путем синтеза общедоступных последовательностей ДНК TCR.

[0372] В некоторых вариантах осуществления TCR получен из биологического источника, например, из клеток, например, из Т-клеток (например, цитотоксических Т-клеток), Т-клеточных гибридом или другого общедоступного источника. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из клеток, выделенных *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой TCR тимусной селекции. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой неопитоп-рестриктированный TCR. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть культивируемой Т-клеточной гибридомой или клоном. В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть или антигенсвязывающий фрагмент могут быть искусственно получены на основе известной последовательности TCR.

[0373] В некоторых вариантах осуществления TCR получен из TCR, идентифицированного или отобранного при скрининге библиотеки кандидатных TCR-рецепторов против полипептидного антигена-мишени или его Т-клеточного эпитопа-мишени. Библиотеки TCR могут быть получены путем амплификации репертуара V α и V β из Т-клеток, выделенных у субъекта, включая клетки, присутствующие в МКИК, селезенке или другом лимфоидном органе. В некоторых случаях Т-клетки могут быть амплифицированы из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). В некоторых вариантах осуществления библиотеки TCR могут быть получены из CD4⁺ или CD8⁺ клеток. В некоторых вариантах осуществления TCR могут быть амплифицированы из источника Т-клеток у нормального здорового субъекта, то есть из библиотек TCR здоровых доноров. В некоторых вариантах осуществления TCR могут быть

амплифицированы из источника Т-клеток больного субъекта, то есть из библиотек TCR больных доноров. В некоторых вариантах осуществления для амплификации репертуара генов V α и V β используют вырожденные праймеры, например, с помощью ОТ-ПЦР в образцах, таких как Т-клетки, полученные у людей. В некоторых вариантах осуществления библиотеки scTv могут быть собраны из наивных библиотек V α и V β , в которых амплифицированные продукты клонированы или собраны для разделения линкером. В зависимости от источника субъекта и клеток, библиотеки могут быть HLA-аллель-специфическими. В альтернативе, в некоторых вариантах осуществления библиотеки TCR могут быть получены путем мутагенеза или диверсификации родительской или каркасной молекулы TCR. В некоторых аспектах TCR подвергаются направленной эволюции, например, путем мутагенеза, например, α - или β -цепи. В некоторых аспектах конкретные остатки в CDR-областях TCR изменены. В некоторых вариантах осуществления отобранные TCR могут быть модифицированы путем созревания аффинности. В некоторых вариантах осуществления антигенспецифические Т-клетки могут быть отобраны, например, путем скрининга для оценки активности ЦТЛ против пептида. В некоторых аспектах TCR, например, присутствующие на антигенспецифических Т-клетках, могут быть отобраны, например, по активности связывания, например, конкретной аффинности или авидности к антигену.

[0374] В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные антигенные рецепторы включают рекомбинантные Т-клеточные рецепторы (TCR) и/или TCR, клонированные из природных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клон Т-клеток с высокой аффинностью к антигену-мишени (например, раковому антигену) идентифицируют, выделяют у пациента и вводят в клетки. В некоторых вариантах осуществления клон TCR к антигену-мишени был получен у трансгенных мышей, созданных с использованием генов иммунной системы человека (например, систему лейкоцитарных антигенов человека или HLA). См., например, опухолевые антигены (см., например, Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15:169-180 и Cohen et al. (2005) J Immunol. 175:5799-5808). В некоторых вариантах осуществления фаговый дисплей используют для выделения TCR-рецепторов против целевого антигена (см., например, Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390-1395 and Li (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354).

[0375] В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть являются такими, которые были модифицированы или сконструированы. В некоторых вариантах осуществления способы направленной эволюции используются для создания TCR с измененными свойствами, например, более высокой аффинностью к конкретному комплексу МНС-пептида. В некоторых вариантах осуществления направленная эволюция достигается методами дисплея, включающими, без ограничения перечисленными, дрожжевой дисплей (Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92), фаговый дисплей (Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54) или Т-клеточный дисплей (Chervin et al. (2008) J. Immunol Methods, 339, 175-84). В некоторых вариантах осуществления подходы дисплея включают

конструирование или модификацию известного, исходного или референсного TCR. Например, в некоторых случаях TCR дикого типа может использоваться в качестве матрицы для получения мутантных TCR, в которых в одном или более остатках CDR-области подвергают мутации и отбирают мутантов с требуемым измененным свойством, таким как более высокая аффинность к нужному антигену-мишени.

[0376] В некоторых вариантах осуществления пептиды полипептида-мишени для применения при получении или создании представляющего интерес TCR являются известными или могут быть легко идентифицированы специалистом. В некоторых вариантах осуществления пептиды, подходящие для применения в создании TCR-рецепторов или антигенсвязывающих частей, могут быть определены по присутствию HLA-рестриктированного мотива в полипептиде-мишени, представляющем интерес, таком как полипептид-мишень, описанный ниже. В некоторых вариантах осуществления пептиды идентифицируют при использовании доступных моделей компьютерного прогнозирования. В некоторых вариантах осуществления для прогнозирования сайтов связывания MHC класса I такие модели включают, без ограничения перечисленными, ProPred1 (Singh and Raghava (2001) *Bioinformatics* 17(12):1236-1237) и SYFPEITHI (см. Schuler et al. (2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 409(1):75-93 2007). В некоторых вариантах осуществления MHC-рестриктированным эпитопом является HLA-A0201, который экспрессируется приблизительно у 39-46% всех представителей европеодной расы и, следовательно, представляет собой подходящий выбор антигена MHC для использования при получении TCR или другой молекулы, связывающей MHC-пептид.

[0377] Известны HLA-A0201-связывающие мотивы и сайты расщепления протеасом и иммунных протеасом при использовании компьютерных моделей прогнозирования. Для прогнозирования сайтов связывания MHC класса I такие модели включают, без ограничения перечисленными, ProPred1 (более подробно описано в публикации Singh and Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237 2001) и SYFPEITHI (см. Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 409(1):75-93 2007).

[0378] В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть может быть рекомбинантно полученным природным белком или его мутантной формой, в которой было изменено одно или более свойств, таких как характеристики связывания. В некоторых вариантах осуществления TCR может быть получен из одного из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса или другое млекопитающее. TCR может быть связанным с клеткой или может находиться в растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления, в рамках предложенных способов, TCR находится в связанной с клеткой форме, экспрессируемой на поверхности клетки.

[0379] В некоторых вариантах осуществления TCR является полноразмерным TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR является антигенсвязывающей частью. В

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

[0380] В некоторых вариантах осуществления TCR содержит последовательность, соответствующую трансмембранной последовательности. В некоторых вариантах осуществления TCR действительно содержит последовательность, соответствующую цитоплазматическим последовательностям. В некоторых вариантах осуществления TCR способен образовывать комплекс TCR с CD3. В некоторых вариантах осуществления любой из TCR-рецепторов, включающих dTCR или scTCR, может быть связан с сигнальными доменами, которые дают активный TCR на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления TCR экспрессируется на поверхности клеток.

[0381] В некоторых вариантах осуществления dTCR содержит первый полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области α -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области α -цепи TCR, и второй полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области β -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области β -цепи TCR, причем первый и второй полипептиды связаны дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления связь может соответствовать нативной межцепочечной дисульфидной связи, присутствующей в нативных димерных $\alpha\beta$ TCR-рецепторах. В некоторых вариантах осуществления межцепочечные дисульфидные связи не присутствуют в нативном TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления один или более цистеинов могут быть включены во внеклеточные последовательности константной области полипептидной пары dTCR. В некоторых случаях может потребоваться и нативная, и ненативная дисульфидная связь. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит трансмембранную последовательность для закрепления в мембране.

[0382] В некоторых вариантах осуществления dTCR содержит α -цепь TCR, содержащую вариабельный α -домен, константный α -домен и первый димеризационный мотив, присоединенный к С-концу константного α -домена, и β -цепь TCR, включающую вариабельный β -домен, константный β -домен и первый димеризационный мотив, присоединенный к С-концу константного β -домена, где первый и второй димеризационные мотивы легко взаимодействуют с образованием ковалентной связи между аминокислотой в первом димеризационном мотиве и аминокислотой во втором димеризационном мотиве, связывая α -цепь TCR и β -цепь TCR друг с другом.

[0383] В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой scTCR. Как правило, scTCR может быть получен с помощью известных способов. См., например, Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wulfig, C. and Pluckthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (USA) 90 3830 (1993); опубликованные

международные заявки PCT WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; и Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит введенную ненативную дисульфидную межцепочечную связь, которая способствует ассоциации цепей TCR (см., например, опубликованную международную заявку PCT WO 03/020763). В некоторых вариантах осуществления scTCR представляет собой не связанный дисульфидными цепями усеченный TCR, в котором гетерологичные лейциновые молнии, слитые с его С-концами, облегчают ассоциацию цепей (см., например, опубликованную международную заявку PCT WO99/60120). В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит TCR α переменный домен, ковалентно соединенный с TCR β переменным доменом через пептидный линкер (см., например, опубликованную международную заявку PCT WO99/18129).

[0384] В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит первый сегмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей переменной области α -цепи TCR, второй сегмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей последовательности переменной области β -цепи TCR, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константного домена β -цепи TCR, и линкерную последовательность, соединяющую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

[0385] В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности переменной области α -цепи, слитой с N-концом внеклеточной последовательности константного домена α -цепи, и второй сегмент, состоящий из последовательности переменной области β -цепи, слитой с N-концом внеклеточной константной последовательности и трансмембранной последовательности β -цепи, и, необязательно, линкерную последовательность, соединяющую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

[0386] В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности переменной области β -цепи TCR, слитой с N-концом внеклеточной последовательности константного домена β -цепи, и второй сегмент, состоящий из последовательности переменной области α -цепи, слитой с N-концом внеклеточной константной последовательности и трансмембранной последовательности α -цепи, и, необязательно, линкерную последовательность, соединяющую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

[0387] В некоторых вариантах осуществления линкер scTCR-рецепторов, соединяющий первый и второй сегменты TCR, может быть любым линкером, способным формировать одну полипептидную цепь при сохранении специфичности связывания TCR. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность может, например, иметь формулу -P-AA-P-, где P представляет собой пролин, и AA представляет собой аминокислотную последовательность, в которой аминокислотами являются глицин и серин. В некоторых вариантах осуществления первый и второй сегменты спарены так, что

их последовательности вариабельной области ориентированы для такого связывания. Следовательно, в некоторых случаях, линкер имеет достаточную длину, чтобы покрывать расстояние между С-концом первого сегмента и N-концом второго сегмента, или наоборот, но не является слишком длинным, чтобы блокировать или уменьшать связывание scTCR с лигандом-мишенью. В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать от или от приблизительно 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)₅-, где Р представляет собой пролин, G представляет собой глицин, и S представляет собой серин (SEQ ID NO:22). В некоторых вариантах осуществления линкер имеет последовательность GSADDAKKDAKKDGKS (SEQ ID NO:23).

[0388] В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, связывающую остаток в иммуноглобулиновой области константного домена α-цепи с остатком в иммуноглобулиновой области константного домена β-цепи. В некоторых вариантах осуществления межцепочечная дисульфидная связь в нативном TCR не присутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления один или более цистеинов могут быть включены во внеклеточные последовательности константной области первого и второго сегментов полипептида scTCR. В некоторых случаях может потребоваться и нативная, и ненативная дисульфидная связь.

[0389] В некоторых вариантах осуществления dTCR или scTCR, содержащих введенные межцепочечные дисульфидные связи, нативные дисульфидные связи не присутствуют. В некоторых вариантах осуществления один или более нативных цистеинов, образующих нативные межцепочечные дисульфидные связи, заменены другим остатком, например, серином или аланином. В некоторых вариантах осуществления введенная дисульфидная связь может быть образована в результате мутации нецистеиновых остатков в первом и втором сегментах с заменой на цистеин. Примерные ненативные дисульфидные связи TCR описаны в опубликованной международной заявке РСТ WO2006/000830.

[0390] В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют аффинность с равновесной константой связывания с антигеном-мишенью от или от приблизительно 10⁻⁵ до 10⁻¹² М, включая все отдельные значения и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень является комплексом МНС-пептида или лигандом.

[0391] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, такие как α и β-цепи, могут быть амплифицированы с помощью ПЦР, клонирования или других подходящих способов и клонированы в подходящий вектор или векторы экспрессии. Вектор экспрессии может быть любым подходящим рекомбинантным вектором экспрессии и может использоваться для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Подходящие векторы включают векторы, созданные для размножения и экспансии и/или для экспрессии, такие

как плазмиды и вирусы.

[0392] В некоторых вариантах осуществления вектор может быть вектором серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), серии pET (Novagen, Madison, Wis.), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), или серии pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). В некоторых случаях также могут использоваться векторы на основе бактериофага, такие как λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 и λ NM1149. В некоторых вариантах осуществления могут использоваться векторы для экспрессии в растениях, включающие pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В некоторых вариантах осуществления векторы экспрессии в животных включают pEUK-CI, pMAM и pMAMneo (Clontech). В некоторых вариантах осуществления используется вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор.

[0393] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены при использовании стандартных технологий рекомбинантных ДНК. В некоторых вариантах осуществления векторы могут содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые являются специфическими для типа организма-хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), в который требуется ввести вектор, в соответствии с требованиями и с учетом того, является ли вектор вектором на основе ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать ненативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей TCR или его антигенсвязывающую часть (или другую молекулу, связывающую МНС-пептид). В некоторых вариантах осуществления промотор может быть невирусным промотором или вирусным промотором, таким как цитомегаловирусный (ЦМВ) промотор, промотор SV40, промотор RSV и промотор, обнаруженный в длинном концевом повторе вирус стволовых клеток мышей. Также предусмотрены другие известные промоторы.

[0394] В некоторых вариантах осуществления, после получения клона Т-клеток, альфа- и бета-цепи TCR выделяют и клонируют в вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления гены TCR-альфа и бета соединены через 2А пептид проскока рибосомы пикорнавируса, в результате чего обе цепи являются коэкспрессирующимися. В некоторых вариантах осуществления генетический перенос TCR осуществляется с помощью ретровирусных или лентивирусных векторов или с помощью транспозонов (см., например, Baum et al. (2006) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 13:1050-1063; Frecha et al. (2010) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 18:1748-1757; и Hackett et al. (2010) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 18:674-683).

[0395] В некоторых вариантах осуществления для получения вектора, кодирующего TCR, α и β -цепи амплифицируют с помощью ПЦР из суммарной кДНК, выделенной из клона Т-клеток, экспрессирующего представляющий интерес TCR, и клонируют в вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления α и β -цепи клонируют в один вектор. В некоторых вариантах осуществления α и β -цепи клонируются

в разные векторы. В некоторых вариантах осуществления полученные α и β -цепи включают в ретровирусный, например лентивирусный, вектор.

3. Химерный рецептор аутоантител (CAAR)

[0396] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор аутоантител (CAAR). В некоторых вариантах осуществления CAAR является специфичным к аутоантителу. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAAR, такая как Т-клетка, модифицированная для экспрессии CAAR, может использоваться для специфичного связывания и уничтожения клеток, экспрессирующих аутоантитела, но не нормальных клеток, экспрессирующих антитела. В некоторых вариантах осуществления CAAR-экспрессирующие клетки можно применять для лечения аутоиммунного заболевания, связанного с экспрессией аутоантигенов, такого как аутоиммунные заболевания. В некоторых вариантах осуществления CAAR-экспрессирующие клетки могут направленно воздействовать на В-клетки, которые в конечном итоге продуцируют аутоантитела и экспонируют аутоантитела на своих клеточных поверхностях, помечая эти В-клетки как специфические для заболевания мишени для терапевтического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления CAAR-экспрессирующие клетки могут использоваться для эффективного направленного воздействия и уничтожения патогенных В-клеток при аутоиммунных заболеваниях путем направленного воздействия на В-клетки, вызывающие заболевание, при использовании антигенспецифичного химерного рецептора аутоантител. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой CAAR, такой как любой, описанный в публикации заявки на патент США US 2017/0051035.

[0397] В некоторых вариантах осуществления CAAR включает связывающий аутоантитело домен, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает основной сигнальный домен, сигнальный домен, который способен индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, включающий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область включает вторичную или костимулирующую сигнальную область (вторичные внутриклеточные сигнальные области).

[0398] В некоторых вариантах осуществления связывающий аутоантитело домен включает аутоантиген или его фрагмент. Выбор аутоантигена может зависеть от типа аутоантитела, являющегося мишенью. Например, аутоантиген может быть выбран, потому что он распознает аутоантитело на клетке-мишени, такой как В-клетка, ассоциированная с конкретным патогенным состоянием, например, аутоиммунным заболеванием, таким как аутоиммунное заболевание, опосредуемое аутоантителами. В

некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание включает вульгарную пузырчатку (ВП). Примеры аутоантигенов включают десмоглеин 1 (Dsg1) и Dsg3.

4. Мультиспецифичное воздействие

[0399] В некоторых вариантах осуществления клетки и способы включают стратегии мультиспецифичного направленного воздействия, например, экспрессию двух или более генетически модифицированных рецепторов на клетке, каждый из которых распознает один и тот же или разные антигены и, как правило, каждый включает определенный внутриклеточный сигнальный компонент. Такие стратегии мультиспецифичного воздействия описаны, например, в публикации международной заявки WO 2014055668 A1 (описание комбинаций активирующих и костимулирующих CAR-рецепторов, например, направленно воздействующих на два разных антигена, присутствующих по отдельности на нецелевых, например нормальных, клетках, но присутствующих вместе только на клетках заболевания или состоянии, подлежащего лечению) и Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (декабрь 2013 года) (описание клеток, экспрессирующих активирующие и ингибирующие CAR-рецепторы, таких как клетки, в которых активирующий CAR связывается с одним антигеном, экспрессируемым как на нормальных или непораженных клетках, так и на клетках заболевания или состояния, подлежащего лечению, а ингибирующий CAR связывается с другим антигеном, экспрессируемым только на нормальных клетках или клетках, которые не желательно подвергать лечению).

[0400] Например, в некоторых вариантах осуществления клетки включают рецептор, экспрессирующий первый генетически сконструированный антигенный рецептор (например, CAR или TCR), который способен индуцировать активирующий или стимулирующий сигнал для клетки, как правило, при специфичном связывании с антигеном, распознаваемым первым рецептором, например, первым антигеном. В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно включает второй генетически сконструированный антигенный рецептор (например, CAR или TCR), например, химерный костимулирующий рецептор, который способен индуцировать костимулирующий сигнал для иммунной клетки, как правило, при специфичном связывании со вторым антигеном, распознаваемым вторым рецептором. В некоторых вариантах осуществления первый антиген и второй антиген являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первый антиген и второй антиген являются разными.

[0401] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй генетически сконструированный антигенный рецептор (например, CAR или TCR) способен вызывать активацию или стимуляцию сигнала для клетки. В некоторых вариантах осуществления рецептор включает внутриклеточный сигнальный компонент, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы. В некоторых вариантах осуществления активация, вызванная первым рецептором, включает сигнальную трансдукцию или изменение экспрессии белка в клетке, которые приводят к инициации иммунного ответа, такие как фосфорилирование ITAM и/или инициация ITAM-опосредованного каскада сигнальной трансдукции,

формирование иммунологического синапса и/или кластеризацию молекул около связанного рецептора (например, CD4 или CD8 и т.д.), активацию одного или более факторов транскрипции, таких как NF-κB и/или AP-1 и/или индукцию экспрессии генов таких факторов, как цитокины, пролиферации и/или выживания.

[0402] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй рецептор включают внутриклеточные сигнальные домены костимулирующих рецепторов, таких как CD28, (4-1BB) CD137, OX40 и/или ICOS. В некоторых вариантах осуществления первый и второй рецептор включают внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора, которые являются разными. В одном варианте осуществления первый рецептор содержит костимулирующую сигнальную область CD28, а второй рецептор содержит костимулирующую сигнальную область 4-1BB, или наоборот.

[0403] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй рецептор включают как внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы, так и внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора.

[0404] В некоторых вариантах осуществления первый рецептор содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы, а второй рецептор содержит внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора. Костимулирующий сигнал в сочетании с активирующим или стимулирующим сигналом, индуцированным в одной клетке, является сигналом, приводящим к иммунному ответу, такому как стойкий и длительный иммунный ответ, такой как повышенная экспрессия гена, секреция цитокинов и других факторов, и опосредованные Т-клетками эффекторные функции, такие как киллинг клеток.

[0405] В некоторых вариантах осуществления ни связывание одного первого рецептора, ни связывание одного второго рецептора не вызывает сильного иммунного ответа. В некоторых аспектах при связывании только одного рецептора клетка становится невосприимчивой или не реагирующей на антиген, или ингибированной, и/или не подвергается индукции пролиферации или секреции факторов или выполнения эффекторных функций. Однако в некоторых таких вариантах осуществления, при связывании множества рецепторов, например, при контакте с клеткой, экспрессирующей первый и второй антигены, достигается требуемый ответ, такой как полная иммунная активация или стимуляция, например, на которую указывает секреция одного или более цитокинов, пролиферация, персистирование и/или выполнение иммунной эффекторной функции, такой как цитотоксический киллинг клетки-мишени.

[0406] В некоторых вариантах осуществления эти два рецептора индуцируют, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал для клетки, при этом связывание одного из рецепторов с его антигеном активирует клетку или вызывает ответ, а связывание второго ингибирующего рецептора с его антигеном индуцирует сигнал, который подавляет или ослабляет такой ответ. Примерами являются комбинации активирующих CAR-рецепторов и ингибирующих CAR-рецепторов или iCAR-рецепторов.

Например, может использоваться такая стратегия, в которой активирующий CAR связывает антиген, экспрессируемый при заболевании или состоянии, но который также экспрессируется на нормальных клетках, а ингибирующий рецептор связывается с отдельным антигеном, который экспрессируется на нормальных клетках, но не на клетках заболевания или состояния.

[0407] В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, дополнительно включают ингибирующие CAR-рецепторы (iCAR, см. Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215)(2013)), такие как CAR, распознающий антиген, отличающийся от антигена, ассоциированного с и/или специфического для заболевания или состояния, посредством которого активирующий сигнал, доставляемый посредством CAR-рецептора, направленно воздействующего на заболевание, уменьшается или ингибируется при связывании ингибирующего CAR со своим лигандом, например, для уменьшения нецелевых эффектов.

[0408] В некоторых вариантах осуществления два рецептора индуцируют, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал для клетки, при этом связывание одного из рецепторов с его антигеном активирует клетку или индуцирует ответ, однако связывание второго ингибирующего рецептора с его антигеном вызывает сигнал, который подавляет или ослабляет этот ответ. Примерами являются комбинации активирующих CAR-рецепторов и ингибирующих CAR-рецепторов (iCAR). Такая стратегия может использоваться, например, для уменьшения вероятности нецелевых эффектов в контексте, в котором активирующий CAR связывает антиген, экспрессируемый при заболевании или состоянии, но который также экспрессируется на нормальных клетках, при этом ингибирующий рецептор связывается с отдельным антигеном, который экспрессируется на нормальных клетках, но не экспрессируется на клетках, ассоциированных с заболеванием или состоянием.

[0409] В некоторых аспектах химерный рецептор представляет собой или включает ингибирующий CAR (например, iCAR) и включает внутриклеточные компоненты, которые ослабляют или подавляют иммунный ответ, такие как ITAM, и/или вызванный стимуляцией ответ в клетке. Примерами таких внутриклеточных сигнальных компонентов являются компоненты, обнаруженные на молекулах иммунных контрольных точек, включая PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, рецепторы PGE2, EP2/4-аденозиновые рецепторы, включая A2AR. В некоторых аспектах модифицированная клетка включает ингибирующий CAR, включающий сигнальный домен из или полученный из такой ингибирующей молекулы, при этом он служит для ослабления ответа клетки, например, который индуцирован активирующим и/или костимулирующим CAR.

[0410] В некоторых вариантах осуществления стратегия мультиспецифичного воздействия используется в случае, когда антиген, ассоциированный с конкретным заболеванием или состоянием, экспрессируется на нормальной клетке и/или экспрессируется на самой модифицированной клетке, транзистентно (например, при

стимуляции в сочетании с генетической модификацией) или постоянно. В таких случаях, при необходимости связывания двух отдельных и индивидуально специфичных антигенных рецепторов, может быть улучшена специфичность, селективность и/или эффективность.

[0411] В некоторых вариантах осуществления множество антигенов, например, первый и второй антигены, экспрессируются на клетке, ткани или заболевании или состоянии, являющемся мишенью, например на раковой клетке. В некоторых аспектах клетка, ткань, заболевание или состояние является множественной миеломой или клеткой множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления один или более из множества антигенов, как правило, также экспрессируются на клетке, которую нежелательно подвергать воздействию клеточной терапии, такой как нормальная или не пораженная заболеванием клетка или ткань и/или сами модифицированные клетки. В таких вариантах осуществления, при необходимости связывания множества рецепторов для достижения ответа клетки, достигается специфичность и/или эффективность.

В. Нуклеиновые кислоты, векторы и способы генетической модификации

[0412] Рекомбинантные белки, такие как рекомбинантные рецепторы, кодируются полинуклеотидами нуклеиновой кислоты (кислот), включая нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, содержащиеся в векторах или конструкциях. В некоторых вариантах осуществления клетки, например Т-клетки, генетически модифицированы для экспрессии рекомбинантного рецептора, например, с использованием способа, в котором одну или более стадий выполняют в присутствии предложенной бессывороточной среды. В некоторых вариантах осуществления модификацию осуществляют путем введения полинуклеотидов, которые кодируют рекомбинантный рецептор.

[0413] В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, содержит сигнальную последовательность, которая кодирует сигнальный пептид. В некоторых аспектах сигнальная последовательность может кодировать сигнальный пептид, полученный из нативного полипептида. В других аспектах сигнальная последовательность может кодировать гетерологичный или ненативный сигнальный пептид, такой как примерный сигнальный пептид альфа-цепи GMCSFR, представленный в SEQ ID NO: 25 и кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24. В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты, 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, представленный в SEQ ID NO: 25 и кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, или сигнальный пептид CD8-альфа, представленный в SEQ ID NO: 26.

[0414] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, содержит по меньшей мере один промотор, функционально

связанный для контроля экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых примерах полинуклеотид содержит два, три или больше промоторов, функционально связанных для контроля экспрессии рекомбинантного рецептора.

[0415] В некоторых случаях, когда молекулы нуклеиновой кислоты кодируют две или более разных полипептидных цепей, например, рекомбинантный рецептор и маркер, каждая из полипептидных цепей может кодироваться отдельной молекулой нуклеиновой кислоты. Например, представлены две отдельные нуклеиновые кислоты, каждая из которых может быть индивидуально перенесена или введена в клетку для экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, и нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связаны с одним и тем же промотором и, необязательно, разделены участком внутренней посадки рибосомы (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, который необязательно представляет собой T2A, P2A, E2A или F2A. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связаны с двумя разными промоторами. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, присутствуют или встроены в разные положения в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, вводят в композицию, содержащую культивируемые клетки, например, путем ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

[0416] В некоторых вариантах осуществления, например, в таких, где полинуклеотид содержит первую и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, где кодирующие последовательности, кодирующие каждую из разных полипептидных цепей, могут быть функционально связаны с промоторами, которые могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты может содержать промотор, который направляет экспрессию двух или больше разных полипептидных цепей. В некоторых вариантах осуществления такие молекулы нуклеиновых кислот могут быть мультицистронными (бицистронными или трицистронными, см., например, патент США 6,060,273). В некоторых вариантах осуществления единицы транскрипции могут быть сконструированы в виде бицистронной единицы, содержащей IRES (участок внутренней посадки рибосомы), который обеспечивает коэкспрессию продуктов генов (например, кодирующих маркер и кодирующих рекомбинантный рецептор) посредством транскрипта с одного промотора. В альтернативе, в некоторых случаях, один промотор может направлять экспрессию РНК, которая содержит в одной открытой рамке считывания (ORF) два или три гена (например, кодирующий маркер и кодирующий рекомбинантный рецептор), отделенные друг от друга последовательностями, кодирующими саморасщепляющийся пептид (например, 2A последовательности) или сайт распознавания протеазы (например, фурина). Таким

образом, ORF кодирует один полипептид, который либо во время (в случае 2A), либо после трансляции превращается в отдельные белки. В некоторых случаях пептид, такой как T2A, может заставить рибосому пропустить (проскок рибосомы) синтез пептидной связи на С-конце 2A элемента, что приводит к разделению между концом 2A последовательности и следующим пептидом по ходу транскрипции (см., например, de Felipe, *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) и de Felipe et al. *Traffic* 5:616-626 (2004)). Известны различные 2A элементы. Примеры 2A последовательностей, которые могут использоваться в способах и системах, раскрытых в настоящем описании, включают, без ограничения, 2A последовательности из вируса ящура (F2A, например, SEQ ID NO: 21), вируса ринита лошадей A (E2A, например, SEQ ID NO: 20), вирус *Thosea asigna* (T2A, например, SEQ ID NO: 6 или 17) и тешовирус свиней 1 (P2A, например, SEQ ID NO: 18 или 19), как описано в патентной публикации США 20070116690.

[0417] Любой из рекомбинантных рецепторов, описанных в настоящем описании, может кодироваться полинуклеотидами, содержащими одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные рецепторы, в любых комбинациях или конфигурациях. Например, один, два, три или более полинуклеотидов могут кодировать один, два, три или более разных полипептидов, например, рекомбинантных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления один вектор или конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую маркер, и отдельный вектор или конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связаны с двумя разными промоторами. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, расположена после нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер.

[0418] В некоторых вариантах осуществления основа вектора содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более маркеров. В некоторых вариантах осуществления один или более маркеров являются маркером трансдукции, суррогатным маркером и/или селективным маркером.

[0419] В некоторых вариантах осуществления маркер является маркером трансдукции или суррогатным маркером. Маркер трансдукции или суррогатный маркер могут использоваться для обнаружения клеток, в которые был введен полинуклеотид, например, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления маркер трансдукции может указывать или подтверждать модификацию клетки. В некоторых вариантах осуществления суррогатный маркер является белком, который предназначен для коэкспрессии на поверхности клеток с рекомбинантным рецептором, например, CAR. В конкретных вариантах осуществления такой суррогатный маркер является поверхностным белком, который был модифицирован, чтобы обладать минимальной активностью. В некоторых вариантах

осуществления суррогатный маркер кодируется тем же полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер, необязательно отделенный участком внутренней посадки рибосомы (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, вызывающий проскок рибосомы, такой как 2A последовательность, такая как T2A, P2A, E2A или F2A. Введенные из вне маркерные гены могут, в некоторых случаях, использоваться в сочетании с модифицированной клеткой для обеспечения обнаружения или отбора клеток и, в некоторых случаях, чтобы также вызывать клеточный суицид.

[0420] Примерные суррогатные маркеры могут включать усеченные формы полипептидов клеточной поверхности, такие как усеченные формы, которые являются нефункциональными и не преобразуют или не способны к преобразованию сигнала или сигнала, обычно преобразовываемого полноразмерной формой полипептида клеточной поверхности, и/или не вызывают или не способны к интернализации. Примерные усеченные полипептиды клеточной поверхности включают усеченные формы факторов роста или других рецепторов, такие как усеченный человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2 (tHER2), усеченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFRt, примерная последовательность EGFRt представлена в 7 или 16) или простатический специфический мембранный антиген (PSMA) или его модифицированную форму. EGFRt может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимаб (Эрбитукс®) или другим терапевтическим антителом против EGFR, или связывающей молекулой, которая может использоваться для идентификации или отбора клеток, которые модифицированы конструкцией EGFRt и рекомбинантным рецептором, таким как химерный антигенный рецептор (CAR), и/или элиминирования или отделения клеток, экспрессирующих рецептор. См. патент США 8,802,374 и Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4):430-434). В некоторых аспектах маркер, например суррогатный маркер, включает весь или часть (например, усеченную форму) CD34, NGFR, CD19 или усеченный CD19, например, усеченный нечеловеческий CD19 или рецептор эпидермального фактора роста (например, EGFRt). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как расщепляемая линкерная последовательность, например, T2A. Например, маркер и, необязательно, линкерная последовательность, могут быть любыми, как раскрыто в публ. PCT WO2014031687. Например, маркер может быть усеченным EGFR (tEGFR), который необязательно соединен с линкерной последовательностью, такой как расщепляемая линкерная последовательность T2A. Примерный полипептид усеченного EGFR (например, tEGFR) включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 7 или 16, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую

идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 или 16.

[0421] В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой или включает флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперфолдер GFP, красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-зеленый флуоресцентный белок (BFP), улучшенный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP), и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты и кодон-оптимизированные и/или улучшенные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой или включает фермент, такой как люциферазу, ген *lacZ* из *E. coli*, щелочную фосфатазу, секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT). Примеры светоиспускающих репортерных генов включают люциферазу (*luc*), β -галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), β -глюкуронидазу (GUS) или их варианты.

[0422] В некоторых вариантах осуществления маркер является селективным маркером. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой или включает полипептид, придающий устойчивость к экзогенным веществам или лекарственным соединениям. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер является геном устойчивости к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер является геном устойчивости к антибиотикам, который придает устойчивость к антибиотикам клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой или включает ген устойчивости к пуромицину, ген устойчивости к гигромицину, ген устойчивости к бластицидину, ген устойчивости к неомицину, ген устойчивости к генетицину или ген устойчивости к зеоцину или их модифицированную форму.

[0423] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки при использовании рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки при использовании рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гаммаретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 November 29(11):550-557).

[0424] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор содержит последовательность длинного концевой повтора (LTR), например, ретровирусный вектор, полученный из вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса мышинных эмбриональных стволовых клеток (MESV), вируса

мышинных стволовых клеток (MSCV) или фокус-формирующего вируса некроза селезенки (SFFV). Большинство ретровирусных векторов получают из мышинных ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления ретровирусы включают вирусы, полученные из любой клетки птицы или млекопитающего в качестве источника. Ретровирусы, как правило, являются амфотропными, что означает то, что они способны инфицировать клетки-хозяева из организмов нескольких видов, включая человека. В одном варианте осуществления ген, который должен экспрессироваться, заменяет ретровирусные последовательности *gag*, *pol* и/или *env*. Было описано множество иллюстративных ретровирусных систем (например, патенты США 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; и Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109).

[0425] Способы лентивирусной трансдукции известны. Примеры таких способов описаны, например, в публикациях Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9):689-701; Cooper et al. (2003) *Blood*. 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506:97-114; и Cavalieri et al. (2003) *Blood*. 102(2):497-505.

[0426] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки путем электропорации (см., например, Chicaibam et al, (2013) *PLoS ONE* 8(3):e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16):1431-1437). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки путем транспозиции (см., например, Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; и Huang et al. (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126). Другие способы введения и экспрессии генетического материала в иммунных клетках включают трансфекцию с фосфатом кальция (например, как описано в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.), слияние протопластов, опосредованную катионными липосомами трансфекцию; бомбардировку с использованием микрочастиц вольфрама (Johnston, *Nature*, 346:776-777 (1990)); и совместное осаждение ДНК фосфатом стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7:2031-2034 (1987)).

[0427] Другие методы и векторы для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, описаны, например, в публикации международной заявки WO2014055668 и патенте США 7,446,190.

[0428] В некоторых вариантах осуществления клетки, например Т-клетки, могут быть трансфицированы во время или после экспансии, например, Т-клеточным рецептором (TCR) или химерным антигенным рецептором (CAR). Такая трансфекция с целью введения гена требуемого рецептора может быть выполнена, например, с использованием любого подходящего ретровирусного вектора. Затем популяцию генетически модифицированных клеток можно освободить от начального стимула (например, стимула против CD3/против CD28) и после этого стимулировать вторым типом стимула, например, посредством *de novo* введенного рецептора). Этот второй тип

стимула может включать антигенный стимул в форме молекулы пептида/МНС, когнатного (перекрестно сшивающего) лиганда генетически введенного рецептора (например, природного лиганда CAR) или любого лиганда (такого как антитело), который непосредственно связывается в каркасной структуре нового рецептора (например, при распознавании константных областей в рецепторе). См., 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).*

[0429] В некоторых случаях может использоваться вектор, который не требует, чтобы клетки, например Т-клетки, были активированы. В некоторых таких случаях клетки могут быть отобраны и/или трансдуцированы до активации. Таким образом, клетки могут быть модифицированы до или после культивирования клеток и, в некоторых случаях, во время или в течение, по меньшей мере, части культивирования.

[0430] Дополнительные нуклеиновые кислоты, например, гены для введения, включают гены, которые улучшают эффективность терапии, например, путем повышения жизнеспособности и/или функции переносимых клеток; гены для обеспечения генетического маркера для отбора и/или оценки клеток, например, для оценки выживания или локализации *in vivo*; гены для повышения безопасности, например, делающие клетку восприимчивой к отрицательному отбору *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); см. также публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 (Lupton et al.), в которых описано применение бифункциональных селективных слитых генов, полученных при слиянии доминантного положительного селективного маркера с отрицательным селективным маркером. См., например, Riddell et al., патент США 6,040,177, в колонках 14-17.

IV. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

[0431] В некоторых вариантах осуществления одну или более композиций, содержащих генетически модифицированные клетки, такие как клетки, полученные или продуцированные в присутствии бессывороточной среды согласно настоящему изобретению вводят в качестве клеточной терапии, например адоптивной клеточной терапии. Модифицированные клетки могут использоваться при различных терапевтических, диагностических и профилактических показаниях. Например, модифицированные клетки или композиции, содержащие модифицированные клетки, могут использоваться в лечении различных заболеваний и нарушений у субъекта. Такие способы и применения включают терапевтические способы и применения, например, включающие введение модифицированных клеток или содержащих их композиций субъекту, имеющему заболевание, состояние или нарушение, такое как опухоль или рак. В некоторых вариантах осуществления модифицированные клетки или содержащие их композиции вводят в эффективном количестве для эффективного лечения заболевания или нарушения. Применения включают применение модифицированных клеток или

композиций в таких способах и способах лечения, а также в получении лекарственного средства для осуществления таких терапевтических способов. В некоторых вариантах осуществления способы осуществляют путем введения модифицированных клеток или содержащих их композиций субъекту, имеющему или подозреваемому на наличие заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления способы, таким образом, лечат заболевание или состояние, или нарушение у субъекта.

[0432] Способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут использоваться в связи со способами и композициями по изобретению. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации заявки на патент США 2003/0170238 (Gruenberg et al.); патенте США 4,690,915 (Rosenberg); Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8(10):577-85). См., например, Themeli et al. (2013) *Nat Biotechnol.* 31(10):928-933; Tsukahara et al. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1):84-9; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4):e61338. Заболевание или состояние, которое лечат, может быть любым, при котором экспрессия антигена ассоциирована и/или участвует в этиологии заболевания или нарушения, например, вызывает, усугубляет или иным образом участвует в таком заболевании, состоянии или нарушении. Типичные заболевания и состояния могут включать заболевания или состояния, ассоциированные со злокачественным новообразованием или перерождением клеток (например, раком), аутоиммунным или воспалительным заболеванием или инфекционным заболеванием, например, вызванным бактериальным, вирусным или другим патогеном. Типичные антигены, которые включают антигены, ассоциированные с различными заболеваниями и состояниями, которые можно лечить, описаны выше. В конкретных вариантах осуществления химерный антигенный рецептор или трансгенный TCR специфично связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием.

[0433] Заболевания, состояния и нарушения включают опухоли, в том числе солидные опухоли, гемобластные злокачественные новообразования и меланомы, а также локализованные и метастатические опухоли, инфекционные заболевания, такие как инфекции, вызванные вирусом или другим патогеном, например ВИЧ, ВГС, ВГВ, ЦМВ, ВПЧ, и паразитарные заболевания, аутоиммунные и воспалительные заболевания. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляет собой опухоль, рак, злокачественное новообразование, неоплазию или другое пролиферативное заболевание или нарушение. Такие заболевания включают, без ограничения перечисленными, лейкоз, лимфому, например, острый миелоидный (или миелогенный) лейкоз (ОМЛ), хронический миелоидный (или миелогенный) лейкоз (ХМЛ), острый лимфоцитарный (или лимфобластный) лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), волосатоклеточный лейкоз (HCL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), лимфому из мантийных клеток (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, лимфому Беркитта, лимфому Ходжкина (ХЛ), неходжкинскую лимфому (НХЛ), анапластическую крупноклеточную лимфому (АККЛ), фолликулярную лимфому, рефрактерную фолликулярную лимфому, диффузную В-крупноклеточную

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

[0434] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние является инфекционным заболеванием или состоянием, таким как, без ограничения перечисленными, вирусные, ретровирусные, бактериальные и протозойные инфекции, иммунодефицит, цитомегаловирус (ЦМВ), вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), аденовирус, ВК полиомавирус. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание или состояние, такое как артрит, например, ревматоидный артрит (РА), диабет I типа, системную красную волчанку (СКВ), воспалительное заболевание кишечника, псориаз, склеродермию, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, болезнь Грейвса, болезнь Крона, рассеянный склероз, астму и/или заболевание или состояние, связанное с трансплантатом.

[0435] В некоторых вариантах осуществления антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, включает $\alpha\upsilon\beta 6$ интегрин (интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, ракового/тестикулярный антиген 1В (СТАГ, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), раково-эмбриональный антиген (РЭА), циклин, циклин А2, хемокиновый лиганд с С-С-мотивом 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, 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 В2, рецептор эфрина А2 (EPHA2), эстрогеновый рецептор, Fc-рецептор-подобный белок 5 (FCRL5; также известный как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), эмбриональный рецептор ацетилхолина (фетальный AchR), фолатсвязывающий белок (FBP), альфа-рецептор фолата, эмбриональный рецептор ацетилхолина, ганглиозид GD2, О-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), член D группы 5 G-белок-сопряженных рецепторов класса C (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, человеческий высокомолекулярный меланома-ассоциированный антиген (HMW-MAA),

поверхностный антиген гепатита В, человеческий лейкоцитарный антиген А1 (HLA-A1), человеческий лейкоцитарный антиген А2 (HLA-A2), альфа-рецептор IL-22 (IL-22R α), альфа-рецептор IL-13 2 (IL-13R α 2), рецептор с доменом вставки киназы (kdr), легкую цепь каппа, молекулу клеточной адгезии L1 (L1CAM), CE7 эпитоп L1-CAM, член А семейства содержащих богатые лейцином повторы белков 8 (LRRC8A), Льюис Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), с-Met, цитомегаловирус мышей (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды члена D группы 2 рецепторов NK-клеток (NKG2D), мелан А (MART-1), невральную молекулу клеточной адгезии (NCAM), онкофетальный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простатический специфический антиген, простатический антиген стволовых клеток (PSCA), простатический специфический мембранный антиген (PSMA), подобный рецепторной тирозинкиназе орфанного рецептора 1 (ROR1), сурвивин, трофобластический гликопротеин (TPBG, также известный как 5T4), опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), тирозиназа-ассоциированный белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), тирозиназа-ассоциированный белок 2 (TRP2, также известный как допахром-таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белок опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или патоген-экспрессируемый антиген, или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы и/или молекулы, экспрессируемые ВИЧ, ВГС, ВГВ или другими патогенами. Антигены, являющиеся мишенью рецепторов, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, таким как любые из известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой или включает CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

[0436] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние является В-клеточным злокачественным новообразованием. В некоторых вариантах осуществления В-клеточное злокачественное новообразование является лейкозом или лимфомой. В некоторых аспектах заболевание или состояние является острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), ОЛЛ взрослых, хроническим лимфобластным лейкозом (ХЛЛ), неходжкинской лимфомой (НХЛ) и диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ). В некоторых случаях заболевание или состояние представляет собой НХЛ, такую как или включающую НХЛ, которая является агрессивной формой НХЛ, диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ), БДУ (de novo и трансформировавшейся из индолентной), первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой (ПМВККЛ), богатой Т-клетками/гистиоцитами В-крупноклеточной лимфомой (TCHRBCL), лимфомой Беркитта, лимфомой из мантийных клеток (MCL) и/или фолликулярной лимфомой (FL), необязательно, фолликулярной лимфомы степени 3В (FL3В). В некоторых аспектах рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфично связывается с антигеном,

ассоциированным с заболеванием или состоянием, или экспрессируется в клетках окружения очага, ассоциированного с В-клеточным злокачественным новообразованием. Антигены, являющиеся мишенями рецепторов, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любые из различных известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления антиген, являющийся мишенью рецептора, представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30 или их комбинации.

[0437] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние является миеломой, такой как множественная миелома. В некоторых аспектах рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфично связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием, или экспрессирующимся в клетках окружения очага, ассоциированного с множественной миеломой. Антигены, являющиеся мишенями рецепторов, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с множественной миеломой. В некоторых аспектах антиген, например второй или дополнительный антиген, такой как специфичный для заболевания антиген и/или родственный ему антиген, экспрессируется на множественной миеломе, такой как антиген созревания В-клеток (BCMA), член D группы 5 класса C G-белок-сопряженных рецепторов (GPCR5D), CD38 (гидролаза циклической АДФ-рибозы), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, CD2 подгруппы 1, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24), BAFF-R, TACI и/или FcRH5. Другие примерные антигены множественной миеломы включают CD56, TIM-3, CD33, CD123, CD44, CD20, CD40, CD74, CD200, EGFR, β 2-микроглобулин, HM1.24, IGF-1R, IL-6R, TRAIL-R1 и рецептор активина типа IIA (ActRIIA). См. Benson and Byrd, *J. Clin. Oncol.* (2012) 30(16): 2013-15; Tao and Anderson, *Bone Marrow Research* (2011):924058; Chu et al., *Leukemia* (2013) 28(4):917-27; Garfall et al., *Discov Med.* (2014) 17(91):37-46. В некоторых вариантах осуществления антигены включают антигены, присутствующие в лимфоидных опухолях, миеломе, СПИД-ассоциированной лимфоме и/или послетрансплантационных лимфопрлиферациях, такие как CD38. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, направленные против таких антигенов, известны и включают, например, описанные в патенте США 8,153,765; 8,603,477, 8,008,450; публикациях US20120189622 или US20100260748; и/или международных публикациях PCT WO2006099875, WO2009080829 или WO2012092612, или WO2014210064. В некоторых вариантах осуществления такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (например, scFv) содержатся в мультиспецифичных антителах, мультиспецифичных химерных рецепторах, таких как мультиспецифичные CAR-рецепторы, и/или мультиспецифичных клетках.

[0438] В некоторых вариантах осуществления антиген является патоген-специфическим или патоген-экспрессируемым антигеном. В некоторых вариантах осуществления антиген является вирусным антигеном (таким как вирусный антиген из ВИЧ, ВГС, ВГВ и т.д.), бактериальными антигенами и/или паразитарными антигенами.

[0439] В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют путем аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают у субъекта, который должен получить клеточную терапию, или из образца, полученного у такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах клетки получают у субъекта, например пациента, нуждающегося в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту.

[0440] В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют путем аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают у субъекта, отличающегося от субъекта, который должен получить или который, в конечном счете, получает клеточную терапию, например, первого субъекта. В таких вариантах осуществления клетки затем вводят другому субъекту, например второму субъекту того же биологического вида. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты являются генетически идентичными. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты являются генетически подобными. В некоторых вариантах осуществления второй субъект экспрессирует такой же класс или супертип HLA, что и первый субъект.

[0441] Клетки, могут вводить любыми подходящими способами, например, путем болюсной инфузии, инъекции, например, внутривенной или подкожной инъекций, внутриглазной инъекции, периокулярной инъекции, субретинальной инъекции, интравитреальной инъекции, транс-септальной инъекции, субскеральной инъекции, внутривитреальной инъекции, внутрикамеральной инъекции, субконъюнктивальной инъекции, субтеноновой инъекции, ретробульбарной инъекции, перибульбарной инъекции или задней окологлобальной доставки. В некоторых вариантах осуществления их вводят парентерально, внутрилегочно и интраназально, и, при необходимости, для местного лечения, внутриочагового введения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления данную дозу вводят путем однократного болюсного введения клеток. В некоторых вариантах осуществления ее вводят путем многократного болюсного введения клеток, например, в течение периода не более 3 дней или путем непрерывного инфузионного введения клеток. В некоторых вариантах осуществления введение дозы клеток или любых дополнительных терапий, например, лимфодеплеционной терапии, интервенционной терапии и/или комбинированной терапии, осуществляют посредством амбулаторной доставки.

[0442] Для профилактики или лечения заболевания, подходящая доза может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, от введения клеток в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории заболевания субъекта и ответа на клетки, а также от решения лечащего врача. Композиции и клетки в некоторых вариантах осуществления соответствующим образом вводят субъекту однократно или в серии

процедур.

[0443] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в качестве части комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством, таким как антитело или модифицированная клетка, или рецептор, или средство, такое как цитотоксическое или терапевтическое средство. Клетки в некоторых вариантах осуществления вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими средствами или в сочетании с другим терапевтическим вмешательством, одновременно или последовательно, в любом порядке. В некоторых контекстах клетки вводят совместно с другой терапией, достаточно близко по времени, таким образом, что популяции клеток усиливают действие одного или более дополнительных терапевтических средств, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят до одного или более дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят после одного или более дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных средств включают цитокин, такой как IL-2, например, для улучшения персистенции. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение химиотерапевтического средства.

[0444] В некоторых вариантах осуществления способы включают введение химиотерапевтического средства, например, кондиционирующего химиотерапевтического средства, например, для уменьшения опухолевой нагрузки перед введением.

[0445] Прекондиционирование субъектов с использованием иммунодеплеционных (например, лимфодеплеционных) терапий в некоторых аспектах может улучшить эффекты адоптивной клеточной терапии (АСТ).

[0446] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способы включают введение прекодиционирующего средства, такого как лимфодеплеционное или химиотерапевтическое средство, такое как циклофосфамид, флударабин или их комбинации, субъекту до начала клеточной терапии. Например, субъекту могут вводить прекодиционирующее средство по меньшей мере за 2 дня, например, по меньшей мере за 3, 4, 5, 6 или 7 дней, до начала клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят прекодиционирующее средство не больше чем за 7 дней, например, не больше чем за 6, 5, 4, 3 или 2 дня, до начала клеточной терапии.

[0447] В некоторых вариантах осуществления субъекта прекодиционируют циклофосфамидом в дозе от или от приблизительно 20 мг/кг до 100 мг/кг, такой как от или от приблизительно 40 мг/кг до 80 мг/кг. В некоторых аспектах субъекта прекодиционируют 60 мг/кг или приблизительно 60 мг/кг циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид могут вводить в однократной дозе или могут вводить во множестве доз, например, вводимых ежедневно, раз в два дня или раз в три дня. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят один раз в день в течение одного или двух дней. В некоторых вариантах осуществления, когда лимфодеплеционное средство включает циклофосфамид, субъекту вводят циклофосфамид

в дозе от или от приблизительно 100 мг/м² до 500 мг/м², такой как от или от приблизительно 200 мг/м² до 400 мг/м² или от 250 мг/м² до 350 мг/м², включительно. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 300 мг/м² циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид могут вводить в однократной дозе или могут вводить во множестве доз, например, вводимых ежедневно, раз в два дня или раз в три дня. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение 3-5 дней. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 300 мг/м² циклофосфамида, ежедневно в течение 3 дней, до начала клеточной терапии.

[0448] В некоторых вариантах осуществления, когда лимфодеплеционное средство включает флударабин, субъекту вводят флударабин в дозе от или от приблизительно 1 мг/м² до 100 мг/м², такой как от или от приблизительно 10 мг/м² до 75 мг/м², от 15 мг/м² до 50 мг/м², от 20 мг/м² до 40 мг/м² или от 24 мг/м² до 35 мг/м², включительно. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 30 мг/м² флударабина. В некоторых вариантах осуществления флударабин могут вводить в однократной дозе или могут вводить во множестве доз, например, вводимых ежедневно, раз в два дня или раз в три дня. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение 3-5 дней. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 30 мг/м² флударабина, ежедневно в течение 3 дней, до начала клеточной терапии.

[0449] В некоторых вариантах осуществления лимфодеплеционное средство включает комбинацию средств, такую как комбинацию циклофосфамида и флударабина. Таким образом, комбинация средств может включать циклофосфамид в любой дозе или схеме применения, таких как описанные выше, и флударабин в любой дозе или схеме применения, таких как описанные выше. Например, в некоторых аспектах субъекту вводят 60 мг/кг (~2 г/м²) циклофосфамида и 3-5 доз 25 мг/м² флударабина перед введением первой или последующей дозы.

[0450] После введения клеток биологическую активность модифицированной популяции клеток в некоторых вариантах осуществления измеряют, например, с помощью любого из множества известных методов. Параметры для оценки включают специфичное связывание модифицированных или природных Т-клеток или другой иммунной клетки с антигеном, *in vivo*, например, с помощью визуализации, или *ex vivo*, например, с помощью проточной цитометрии или ИФА. В некоторых вариантах осуществления способность модифицированных клеток разрушать клетки-мишени может быть измерена с помощью любых подходящих известных методов, таких как пробы на цитотоксичность, описанные, например, в публикациях Kochenderfer et al., *J. Immunotherapy*, 32(7):689-702 (2009), и Herman et al. *J. Immunological Methods*, 285(1):25-40 (2004). В некоторых вариантах осуществления биологическую активность клеток измеряют путем анализа экспрессии и/или секреции одного или более цитокинов, таких как CD107a, IFN γ , IL-2 и ФНО. В некоторых аспектах биологическую активность измеряют путем оценки клинического

результата, такого как снижение опухолевой массы или нагрузки.

[0451] В некоторых вариантах осуществления модифицированные клетки дополнительно модифицируют любым количеством способов, в результате чего их терапевтическая или профилактическая эффективность повышается. Например, модифицированный CAR или TCR, экспрессируемый популяцией, может быть конъюгирован напрямую или ненапрямую через линкер с направляющим фрагментом. Практика конъюгирования соединений, например, CAR или TCR, с направляющими фрагментами известна. См., например, Wadwa et al., *J. Drug Targeting* 3: 111 (1995) и патент США 5,087,616.

[0452] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в качестве части комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством, таким как антитело или модифицированная клетка, или рецептор, или средство, такое как цитотоксическое или терапевтическое средство. Клетки в некоторых вариантах осуществления вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими средствами или в сочетании с другим терапевтическим вмешательством, одновременно или последовательно, в любом порядке. В некоторых контекстах клетки вводят совместно с другой терапией, достаточно близко по времени, таким образом, что популяции клеток усиливают действие одного или более дополнительных терапевтических средств, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят до одного или более дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят после одного или более дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных средств включают цитокин, такой как IL-2, например, для улучшения персистирования.

А. Введение доз

[0453] В некоторых вариантах осуществления дозу клеток вводят субъектам в соответствии с предложенными способами и/или с предложенными изделиями или композициями. В некоторых вариантах осуществления величина или график введения доз определяются в зависимости от конкретного заболевания или состояния у субъекта. В некоторых случаях величина или график введения доз при конкретном заболевании могут быть определены эмпирически с учетом представленного описания.

[0454] В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает от или от приблизительно 2×10^5 клеток/кг до или до приблизительно 2×10^6 клеток/кг, например, от или от приблизительно 4×10^5 клеток/кг до или до приблизительно 1×10^6 клеток/кг или от или от приблизительно 6×10^5 клеток/кг до или до приблизительно 8×10^5 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает не больше 2×10^5 клеток (например, антиген-экспрессирующих, таких как CAR-экспрессирующие клетки) на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, не больше чем или приблизительно 3×10^5 клеток/кг, не больше чем или приблизительно 4×10^5 клеток/кг, не больше чем или приблизительно 5×10^5 клеток/кг, не больше чем или приблизительно 6×10^5 клеток/кг, не

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

[0455] В некоторых вариантах осуществления клетки или отдельные популяции подтипов клеток вводят субъекту в пределах от или от приблизительно 0,1 миллиона до или до приблизительно 100 миллиардов клеток и/или такое количество клеток на килограмм массы тела субъекта, такое как, например, от или от приблизительно 0,1 миллиона до или до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, 5 миллионов или приблизительно 5 миллионов клеток, 25 миллионов или приблизительно 25 миллионов клеток, 500 миллионов или приблизительно 500 миллионов клеток, 1 миллиард или приблизительно 1 миллиард клеток, 5 миллиардов или приблизительно 5 миллиардов клеток, 20 миллиардов или приблизительно 20 миллиардов клеток, 30 миллиардов или приблизительно 30 миллиардов клеток, 40 миллиардов или приблизительно 40 миллиардов клеток, или в пределах, определенных любыми двумя из предыдущих значений), от или от приблизительно 1 миллиона до или до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, 5 миллионов или приблизительно 5 миллионов клеток, 25 миллионов или приблизительно 25 миллионов клеток, 500 миллионов или приблизительно 500 миллионов клеток, 1 миллиард или приблизительно 1 миллиард клеток, 5 миллиардов или приблизительно 5 миллиардов клеток, 20 миллиардов или приблизительно 20 миллиардов клеток, 30 миллиардов или приблизительно 30 миллиардов клеток, 40 миллиардов или приблизительно 40 миллиардов клеток, или в пределах, определенных любыми двумя из предыдущих значений), например, от или от приблизительно 10 миллионов до или до приблизительно 100 миллиардов клеток (например, 20 миллионов или приблизительно 20 миллионов клеток, 30 миллионов или приблизительно 30 миллионов клеток, 40 миллионов или приблизительно 40 миллионов клеток, 60 миллионов или приблизительно 60 миллионов клеток, 70 миллионов или приблизительно

70 миллионов клеток, 80 миллионов или приблизительно 80 миллионов клеток, 90 миллионов или приблизительно 90 миллионов клеток, 10 миллиардов или приблизительно 10 миллиардов клеток, 25 миллиардов или приблизительно 25 миллиардов клеток, 50 миллиардов или приблизительно 50 миллиардов клеток, 75 миллиардов или приблизительно 75 миллиардов клеток, 90 миллиардов или приблизительно 90 миллиардов клеток, или в пределах, определенных любыми двумя из предыдущих значений), и, в некоторых случаях, от или от приблизительно 100 миллионов клеток до или до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, 120 миллионов или приблизительно 120 миллионов клеток, 250 миллионов или приблизительно 250 миллионов клеток, 350 миллионов или приблизительно 350 миллионов клеток, 650 миллионов или приблизительно 650 миллионов клеток, 800 миллионов или приблизительно 800 миллионов клеток, 900 миллионов или приблизительно 900 миллионов клеток, 3 миллиарда или приблизительно 3 миллиарда клеток, 30 миллиардов или приблизительно 30 миллиардов клеток, 45 миллиардов или приблизительно 45 миллиардов клеток) или любое значение между указанными пределами и/или на килограмм массы тела субъекта. Дозы могут изменяться в зависимости от признаков, определенных для заболевания или нарушения, и/или пациента, и/или другого лечения. В некоторых вариантах осуществления такие значения относятся к количествам экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток; в других вариантах осуществления они относятся к вводимому количеству Т-клеток или МКПК или суммарных клеток.

[0456] В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъектом является человек, доза включает меньше чем приблизительно 5×10^8 суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), например, в пределах от или от приблизительно 1×10^6 до или до приблизительно 5×10^8 таких клеток, например, до или до приблизительно 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$ или 5×10^8 таких суммарных клеток или в пределах между любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъектом является человек, доза включает больше чем или приблизительно 1×10^6 суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) и меньше чем или приблизительно 2×10^9 суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), например, в пределах от или от приблизительно $2,5 \times 10^7$ до или до приблизительно $1,2 \times 10^9$ таких клеток, например, до или до приблизительно $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$, 8×10^8 или $1,2 \times 10^9$ таких суммарных клеток или в пределах между любыми двумя из предыдущих значений.

[0457] В некоторых вариантах осуществления доза генетически модифицированных клеток включает от или от приблизительно 1×10^5 до или до приблизительно 5×10^8 суммарных CAR-экспрессирующих (CAR^+) Т-клеток, от или от приблизительно 1×10^5 до или до приблизительно $2,5 \times 10^8$ суммарных CAR-

[illegible]

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

[0458]	В	некоторых	вариантах	осуществления	доза	генетически
модифицированных	клеток	включает	по меньшей	мере от или	от приблизительно	1×10^5
экспрессирующих	CAR	клеток,	по меньшей	мере или	приблизительно	$2,5 \times 10^5$
экспрессирующих	CAR	клеток,	по меньшей	мере или	приблизительно	5×10^5
экспрессирующих	CAR	клеток,	по меньшей	мере или	приблизительно	1×10^6
экспрессирующих	CAR	клеток,	по меньшей	мере или	приблизительно	$2,5 \times 10^6$
экспрессирующих	CAR	клеток,	по меньшей	мере или	приблизительно	5×10^6
экспрессирующих	CAR	клеток,	по меньшей	мере или	приблизительно	1×10^7
экспрессирующих	CAR	клеток,	по меньшей	мере или	приблизительно	$2,5 \times 10^7$
экспрессирующих	CAR	клеток,	по меньшей	мере или	приблизительно	5×10^7
экспрессирующих	CAR	клеток,	по меньшей	мере или	приблизительно	1×10^8
экспрессирующих	CAR	клеток,	по меньшей	мере или	приблизительно	$1,5 \times 10^8$
экспрессирующих	CAR	клеток,	по меньшей	мере или	приблизительно	$2,5 \times 10^8$
экспрессирующих	CAR	клеток	или по меньшей	мере или	приблизительно	5×10^8
экспрессирующих	CAR	клеток.				

[0459] В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия включает введение дозы, включающей количество клеток от или от приблизительно 1×10^5 до или до приблизительно 5×10^8 суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток,

суммарных Т-клеток или суммарных моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), от или от приблизительно 5×10^5 до или до приблизительно 1×10^7 суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, суммарных Т-клеток или суммарных моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) или от или от приблизительно 1×10^6 до или до приблизительно 1×10^7 суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, суммарных Т-клеток или суммарных моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), все включительно. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия включает введение дозы клеток, включающей количество клеток по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^5 суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, суммарных Т-клеток или суммарных моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), такое как по меньшей мере или по меньшей мере 1×10^6 , по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^7 , по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^8 таких клеток. В некоторых вариантах осуществления количество указано в отношении общего количества $CD3^+$ или $CD8^+$, в некоторых случаях также экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR^+) клеток. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия включает введение дозы, включающей количество клеток от или от приблизительно 1×10^5 до или до приблизительно 5×10^8 суммарных $CD3^+$ или $CD8^+$ Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD3^+$ или $CD8^+$ клеток, от или от приблизительно 5×10^5 до или до приблизительно суммарных 1×10^7 $CD3^+$ или $CD8^+$ Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD3^+$ или $CD8^+$ клеток или от или от приблизительно 1×10^6 до или до приблизительно 1×10^7 суммарных $CD3^+$ или $CD8^+$ Т-клеток или $CD3^+$ или экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия включает введение дозы, включающей количество клеток от или от приблизительно 1×10^5 до или до приблизительно 5×10^8 суммарных $CD3^+/CAR^+$ или $CD8^+/CAR^+$ клеток, от или от приблизительно 5×10^5 до или приблизительно 1×10^7 суммарных $CD3^+/CAR^+$ или $CD8^+/CAR^+$ клеток или от или от приблизительно 1×10^6 до или до приблизительно 1×10^7 суммарных $CD3^+/CAR^+$ или $CD8^+/CAR^+$ клеток, все включительно.

[0460] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки дозы включают $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки или $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки.

[0461] В некоторых вариантах осуществления, например, где субъектом является человек, $CD8^+$ Т-клетки дозы, в том числе в дозе, включающей $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки, включают от или от приблизительно 1×10^6 до или до приблизительно 5×10^8 суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) $CD8^+$ клеток, например, в пределах от или от приблизительно 5×10^6 до или до приблизительно 1×10^8 таких клеток, например, 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$ или 5×10^8 таких суммарных клеток или в пределах между любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят множество доз, причем каждая из доз или

суммарная доза может быть в пределах любого из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает введение от или от приблизительно 1×10^7 до или до приблизительно $0,75 \times 10^8$ суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, от или от приблизительно 1×10^7 до или до приблизительно 5×10^7 суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, от или от приблизительно 1×10^7 до или до приблизительно $0,25 \times 10^8$ суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает введение от или от приблизительно 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$ или 5×10^8 суммарных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток.

[0462] В некоторых вариантах осуществления доза клеток, например, экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, вводят субъекту в виде однократной дозы или вводят только в один раз в течение периода длительностью две недели, один месяц, три месяца, шесть месяцев, 1 год или больше.

[0463] В контексте адоптивной клеточной терапии введение данной "дозы" охватывает введение данного количества или количества клеток в виде одной композиции и/или одного непрерывного введения, например, в виде однократной инъекции или непрерывной инфузии, и также охватывает введение данного количества или числа клеток в виде дробной дозы или в виде множества композиций, представленных во множестве отдельных композиций или инфузий, в течение установленного периода времени, такого как не больше 3 дней. Таким образом, в некоторых контекстах доза является однократным или непрерывным введением конкретного количества клеток, сделанным или начатым в одной временной точке. В некоторых контекстах, тем не менее, дозу вводят в многократных инъекциях или инфузиях в течение не больше чем трех дней, например, один раз в день в течение трех дней или в течение двух дней, или путем многократных инфузий в течение одних суток.

[0464] Таким образом, в некоторых аспектах клетки дозы вводят в одной фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления клетки дозы вводят во множестве композиций, в совокупности содержащих клетки дозы.

[0465] В некоторых вариантах осуществления термин "дробная доза" относится к дозе, разделенной так, что ее вводят в течение больше чем одного дня. Такой тип введения доз охвачен настоящими способами и считается однократной дозой.

[0466] Таким образом, дозу клеток могут вводить в виде дробной дозы, например дробной дозы, вводимой в течение некоторого времени. Например, в некоторых вариантах осуществления дозу могут вводить субъекту в течение 2 дней или в течение 3 дней. Примерные способы введения дробных доз включают введение 25% дозы в первый день и введение оставшихся 75% дозы во второй день. В других вариантах осуществления 33% дозы могут вводить в первый день, а оставшиеся 67% вводят во второй день. В некоторых аспектах 10% дозы вводят в первый день, 30% дозы вводят во второй день и 60% дозы вводят в третий день. В некоторых вариантах осуществления дробная доза

распространяется не больше чем на 3 дня.

[0467] В некоторых вариантах осуществления клетки дозы могут вводить путем введения множества композиций или растворов, таких как первый и второй, необязательно больше, при этом каждый содержит некоторое количество клеток дозы. В некоторых аспектах множество композиций, каждая из которых содержит разные популяции и/или подтипы клеток, вводят отдельно или независимо, необязательно в течение определенного периода времени. Например, популяции или подтипы клеток могут включать CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки, соответственно, и/или CD8⁺ и CD4⁺ обогащенные популяции, соответственно, например, каждые из CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток индивидуально включают клетки, генетически модифицированные для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления введение дозы включает введение первой композиции, включающей дозу CD8⁺ Т-клеток или дозу CD4⁺ Т-клеток, и введение второй композиции, включающей другую дозу CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток.

[0468] В некоторых вариантах осуществления введение композиции или дозы, например введение множества композиций клеток, включает введение композиций клеток отдельно. В некоторых аспектах отдельные введения выполняют одновременно или последовательно, в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления доза включает первую композицию и вторую композицию, причем первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от 0 до 12 часов, с интервалом от 0 до 6 часов или с интервалом от 0 до 2 часов. В некоторых вариантах осуществления начало введения первой композиции и начало введения второй композиции выполняют с интервалом не больше 2 часов, не больше 1 часа или не больше 30 минут, с интервалом не больше 15 минут, не больше 10 минут или не больше 5 минут. В некоторых вариантах осуществления начало и/или завершение введения первой композиции и завершение и/или начало введения второй композиции выполняют с интервалом не больше 2 часов, не больше 1 часа или не больше 30 минут, с интервалом не больше 15 минут, не больше 10 минут или не больше 5 минут.

[0469] В некоторой композиции первая композиция, например первая композиция дозы, включает CD4⁺ Т-клетки. В некоторой композиции первая композиция, например первая композиция дозы, включает CD8⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления первую композицию вводят до второй композиции.

[0470] В некоторых вариантах осуществления доза или композиция клеток включает определенное или целевое отношение CD4⁺ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, к CD8⁺ клеткам, экспрессирующим рекомбинантный рецептор, и/или CD4⁺ клеток к CD8⁺ клеткам, где указанное отношение необязательно составляет приблизительно 1:1 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1, такое как приблизительно 1:1. В некоторых аспектах введение композиции или дозы с целевым или требуемым отношением различных популяций клеток (таким как отношение CD4⁺:CD8⁺ или отношение CAR:CD4⁺:CAR:CD8⁺, например, 1:1) включает введение

композиции клеток, содержащей одну из популяций и затем введение отдельной композиции клеток, включающей другую популяцию, где введение осуществляют при или приблизительно при целевом или требуемом отношении. В некоторых аспектах введение дозы или композиции клеток в определенном отношении приводит к улучшенной экспансии, персистированию и/или противоопухолевой активности Т-клеточной терапии.

[0471] В некоторых вариантах осуществления субъект получает многократные дозы, например, две или больше доз, или многократные последующие дозы, клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят две дозы. В некоторых вариантах осуществления субъект получает последующую дозу, например, вторую дозу вводят через приблизительно 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления многократные последующие дозы вводят после первой дозы, при этом дополнительную дозу или дозы вводят после введения последующей дозы. В некоторых аспектах количество клеток, вводимых субъекту в дополнительной дозе, является таким же или подобным первой дозе и/или последующей дозе. В некоторых вариантах осуществления дополнительная доза или дозы больше, чем предыдущие дозы.

[0472] В некоторых аспектах величину первой и/или последующей дозы определяют на основе одного или более критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например химиотерапию, время заболевания у субъекта, например, опухолевая нагрузка, масса, размер или степень, степень или тип метастазирования, стадия, и/или вероятность или частота развивающихся у субъекта токсических последствий, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома распада опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа организма против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

[0473] В некоторых аспектах время между введением первой дозы и введением последующей дозы составляет от приблизительно 9 до приблизительно 35 дней, от приблизительно 14 до приблизительно 28 дней или 15-27 дней. В некоторых вариантах осуществления введение последующей дозы производят больше чем через приблизительно 14 дней и меньше чем через приблизительно 28 дней после введения первой дозы. В некоторых аспектах время между первой и последующей дозой составляет приблизительно 21 день. В некоторых вариантах осуществления дополнительную дозу или дозы, например последующие дозы, вводят после введения последующей дозы. В некоторых аспектах дополнительную последующую дозу или дозы вводят по меньшей мере через приблизительно 14 и меньше чем через приблизительно 28 дней после введения предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления дополнительную дозу вводят меньше чем через приблизительно 14 дней после предшествующей дозы, например, через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 дней после предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления никакую дозу не вводят меньше чем через приблизительно 14 дней после предшествующей дозы и/или никакую дозу не вводят больше чем через приблизительно 28 дней после предшествующей дозы.

[0474] В некоторых вариантах осуществления доза клеток, например, клеток, экспрессирующих рекомбинантных рецептор, включает две дозы (например, двойную дозу), включающие первую дозу Т-клеток и последующую дозу Т-клеток, где одна или обе из первой дозы и второй дозы включают введение дробной дозы Т-клеток.

[0475] В некоторых вариантах осуществления доза клеток обычно является достаточно большой, чтобы быть эффективной при уменьшении бремени заболевания.

[0476] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в требуемой дозе, в некоторых аспектах включающей требуемую дозу или количество клеток, или тип(ы) клеток и/или требуемое отношение типов клеток. Таким образом, доза клеток в некоторых вариантах осуществления основана на общем количестве клеток (или числе на кг массы тела) и требуемом отношении отдельных популяций или подтипов, таком как отношение $CD4^+$ к $CD8^+$. В некоторых вариантах осуществления доза клеток основана на требуемом суммарном количестве (или числе на кг массы тела) клеток в отдельных популяциях или отдельных типов клеток. В некоторых вариантах осуществления доза основана на комбинации таких особенностей, таких как требуемое количество всех клеток, требуемое отношение и требуемое общее количество клеток в отдельных популяциях.

[0477] В некоторых вариантах осуществления популяции или подтипы клеток, таких как $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки, вводят при или в пределах переносимого различия требуемой дозы всех клеток, такой как требуемая доза Т-клеток. В некоторых аспектах требуемая доза представляет собой требуемое количество клеток или требуемое количество клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, например, клеток/кг. В некоторых аспектах требуемая доза находится на уровне или выше минимального количества клеток или минимального количества клеток на единицу массы тела. В некоторых аспектах среди всех клеток, вводимых в требуемой дозе, присутствуют отдельные популяции или подтипы с или приблизительно требуемым отношением на выходе (таким как отношение $CD4^+$ к $CD8^+$), например, в пределах некоторого переносимого различия или погрешности такого отношения.

[0478] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят при или в пределах переносимого различия требуемой дозы одной или больше отдельных популяций или подтипов клеток, такой как требуемая доза $CD4^+$ клеток и/или требуемая доза $CD8^+$ клеток. В некоторых аспектах требуемая доза представляет собой требуемое количество клеток подтипа или популяции или требуемое количество таких клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, например, клеток/кг. В некоторых аспектах требуемая доза находится на уровне или выше минимального количества клеток популяции или подтипа или минимального количества клеток популяции или подтипа на единицу массы тела.

[0479] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления доза основана на требуемой фиксированной дозе всех клеток и требуемом отношении, и/или основана на требуемой фиксированной дозе одного или более, например каждого из, отдельных подтипов или субпопуляций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления доза

основана на требуемой фиксированной или минимальной дозе Т-клеток и требуемом отношении CD4⁺ к CD8⁺ клеткам, и/или основана на требуемой фиксированной или минимальной дозе CD4⁺ и/или CD8⁺ клеток.

[0480] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в или в пределах переносимого диапазона требуемого отношения на выходе множества популяций или подтипов клеток, таких как CD4⁺ и CD8⁺ клетки или подтипы. В некоторых аспектах требуемое отношение может быть определенным отношением или может быть диапазоном отношений. Например, в некоторых вариантах осуществления требуемое отношение (например, отношение CD4⁺ к CD8⁺ клеткам) составляет от или от приблизительно 5:1 до или до приблизительно 5:1 (или больше чем приблизительно 1:5 и меньше чем приблизительно 5:1), или от или от приблизительно 1:3 до или до приблизительно 3:1 (или больше чем приблизительно 1:3 и меньше чем приблизительно 3:1), такое как от или от приблизительно 2:1 до или до приблизительно 1:5 (или больше чем приблизительно 1:5 и меньше чем приблизительно 2:1, такое как или приблизительно 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9, 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 или 1:5. В некоторых аспектах переносимое различие составляет в пределах приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50% требуемого отношения, включая любое значение между указанными диапазонами.

[0481] В конкретных вариантах осуществления количества и/или концентрации клеток относятся к количеству клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В других вариантах осуществления количества и/или концентрации клеток относятся к количеству или концентрации всех вводимых клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК).

[0482] В некоторых аспектах величину дозы определяют на основе одного или более критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например, химиотерапию, бремя заболевания у субъекта, например, опухолевая нагрузка, масса, размер или степень, степень или тип метастазирования, стадия и/или вероятность, или уровень развивающихся у субъекта токсических последствий, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома распада опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа организма против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

[0483] В некоторых вариантах осуществления способы также включают введение одной или более дополнительных доз клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), и/или лимфодеплеционной терапии и/или повтор одной или более стадий способов. В некоторых вариантах осуществления одна или более дополнительных доз являются такими же, как начальная доза. В некоторых вариантах осуществления одна или более дополнительных доз отличаются от начальной дозы, например, выше, например, в 2

раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз или в 10 раз или более раз выше, чем начальная доза, или ниже, например, ниже, например, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз или в 10 раз или более раз ниже, чем начальная доза. В некоторых вариантах осуществления введение одной или более дополнительных доз определяют на основе ответа субъекта на первоначальное лечение или любое предшествующее лечение, бремя заболевания у субъекта, например, опухолевая нагрузка, масса, размер или степень, степень или тип метастазирования, стадия и/или вероятность или частота развития у субъекта токсических последствий, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома распада опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа организма против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

V. ИЗДЕЛИЯ И НАБОРЫ

[0484] Также изобретение относится к изделиям, содержащим композицию бессывороточной среды, базальную среду или добавку, такие как описанные в настоящем описании, и дополнительные инструкции по получению или применению композиции. Изделия могут включать контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку на контейнере или связанные с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты для внутривенных растворов и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер в некоторых вариантах осуществления содержит композицию, которая присутствует сама по себе или в комбинации с другой композицией, эффективной для лечения, предотвращения и/или диагностики состояния. В некоторых вариантах осуществления контейнер имеет стерильный порт доступа. Примеры контейнеров включают пакеты с растворами для внутривенного введения, флаконы, в том числе с пробками, прокалываемыми иглой для инъекции, или бутылки или флаконы для средств, вводимых перорально. На этикетке или вкладыше в упаковку может быть указано, что композиция используется для лечения заболевания или состояния.

[0485] В некоторых вариантах осуществления изделие включает: (а) первый контейнер, содержащий базальные среды по изобретению, например, содержащий дипептидную форму L-глутамина в базальной среде; и (b) второй контейнер, содержащий добавку по изобретению, такую как первая добавка, содержащая свободную форму глутамина, например, L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления изделие дополнительно включает третий контейнер, содержащий одну или более дополнительных добавок.

[0486] В некоторых вариантах осуществления изделие включает: (а) один или более контейнеров с композицией, содержащейся в них, такой как описанная в настоящем описании (например, бессывороточной средой или каждым из компонентов для приготовления бессывороточной среды, каждый из которых содержится в отдельном контейнере, таким как базальная среда и одна или более добавок, например, по меньшей мере, первая добавка и одна или более дополнительных или вторых добавок), и (b) дополнительный контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция включает

культивируемые и/или получаемые клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки являются первичными клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой иммунные клетки или обогащенные иммунные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки являются Т-клетками или обогащенными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки являются CD4⁺ Т-клетками или обогащенными CD4⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки являются CD8⁺ Т-клетками или обогащенными CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки содержат клетки, которые подлежат генетической модификации или генетически модифицированы. В некоторых вариантах осуществления клетки содержат обогащенную популяцию клеток, которые подлежат генетической модификации или генетически модифицированы. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки содержат генетически модифицированные Т-клетки или обогащенную популяцию генетически модифицированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки содержат Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), или обогащенные Т-клетки, экспрессирующие CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки были предварительно подвергнуты криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления клетки культивировали в бессывороточной среде и криоконсервировали после культивирования.

[0487] В некоторых вариантах осуществления изделие включает: (а) первый контейнер с композицией, содержащейся в нем, такой как композиции, описанные в настоящем описании (например, бессывороточные среды или каждый из компонентов для приготовления бессывороточных сред, каждый из которых содержится в отдельном контейнере, такой как базальная среда и одна или более добавок, например, по меньшей мере первая добавка и одна или более дополнительных добавок или вторая добавка), (b) второй контейнер с композицией, содержащейся в нем, где композиция включает культивируемые и/или получаемые клетки, (с) вектор, включающий ген (например, ген, кодирующий рекомбинантный белок). В некоторых вариантах осуществления вектор является лентивирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления ген кодирует химерный антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор включает антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с опухолевой клеткой.

VI. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0488] Если не указано иное, все термины из уровня техники, примечания и другие технические и научные термины или терминология, используемая в настоящем описании, должны иметь такое же значение, какое обычно известно среднему специалисту в данной области техники, к которой относится заявленное изобретение. В некоторых случаях термины с обычно известными значениями определены в настоящем описании для ясности и/или для удобства ссылки, причем не следует обязательно считать, что включение таких определений в настоящее описание представляет существенные различия с тем, что обычно известно в уровне техники.

[0489] При использовании в настоящем описании формы единственного числа включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Например, форма единственного числа означает "по меньшей мере один" или "один или более". Следует понимать, что аспекты и варианты, описанные в настоящем описании, включают "состоящие" и/или "состоящие по существу из" аспектов и вариантов.

[0490] По всему тексту настоящего описания различные аспекты заявленного изобретения представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона приведено лишь для удобства и краткости и не должно рассматриваться в качестве строгого ограничения объема заявленного изобретения. Таким образом, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в этом диапазоне. Например, когда представлен диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение между верхней и нижней границами этого диапазона и любым другим установленным или промежуточным значением в указанном диапазоне включено в заявленное изобретение. Верхняя и нижняя границы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также охвачены заявленным изобретением с учетом любой прямо исключенной границы в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает одну или обе границы, диапазоны, исключающие одну или обе из этих включенных границ, также включены в заявленное изобретение. Это используется независимо от широты диапазона.

[0491] Термин "приблизительно" при использовании в настоящем описании относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, который известен специалисту в данной области техники. Ссылка на "приблизительно" значение или параметр в настоящем описании включает (и описывает) варианты осуществления, направленные на данное значение или параметр, как таковые. Например, описание, относящееся к "приблизительно X", включает описание "X".

[0492] При использовании в настоящем описании выражение, что положения нуклеотидов или аминокислот "соответствуют" положениям нуклеотидов или аминокислот в раскрытой последовательности, такой как представленная в Списке последовательностей, относится к положениям нуклеотидов или аминокислот, идентифицированных при выравнивании с раскрытой последовательностью с получением максимальной идентичности при использовании стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP. При выравнивании последовательностей специалист в данной области сможет идентифицировать соответствующие остатки, например, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве гидов. Как правило, для идентификации соответствующих положений последовательности аминокислот выравнивают так, чтобы получить соответствие наивысшего порядка (см., например: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds.,

Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073).

[0493] Термин "вектор" при использовании в настоящем описании относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к воспроизведению другой нуклеиновой кислоты, с которой она соединена. Термин включает вектор в качестве самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы именуется в настоящем описании как "векторы экспрессии". Векторы включают вирусные векторы, такие как ретровирусные, например гаммаретровирусные и лентивирусные, векторы.

[0494] Термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используются попеременно и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первичную трансформированную клетку и ее потомство, независимо от количества пассажей. Потомство может быть не полностью идентичным по содержанию нуклеиновой кислоты с исходной клеткой, но может содержать мутации. Мутантное потомство, которое имеет такую же функцию или биологическую активность, на которую производили скрининг или отбор первоначально трансформированной клетки, включено в настоящее описание.

[0495] При использовании в настоящем описании утверждение того, что клетка или популяция клеток является "положительной" на конкретный маркер, относится к обнаружимому присутствию на или в клетке конкретного маркера, как правило, поверхностного маркера. При указании поверхностного маркера, данный термин относится к присутствию поверхностной экспрессии, обнаруживаемой с помощью проточной цитометрии, например, при окрашивании антителом, которое специфично связывается с маркером, и обнаружении указанного антитела, где окрашивание детектируют с помощью проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем окрашивание, детектируемое при выполнении такой же процедуры с изотипически совпадающим контролем в идентичных по остальным параметрам условиях, и/или на уровне, по существу аналогичном таковому для клетки, которая, как известно, является положительной на маркер, и/или на уровне, существенно превышающем уровень для клетки, которая, как известно, является отрицательной на маркер.

[0496] При использовании в настоящем описании утверждение того, что клетка или популяция клеток является "отрицательной" на конкретный маркер, относится к отсутствию существенного поддающегося обнаружению присутствия на или в клетке конкретного маркера, как правило, поверхностного маркера. При указании поверхностного маркера, данный термин относится к отсутствию поверхностной экспрессии, обнаруживаемой с помощью проточной цитометрии, например, при

окрашивании антителом, которое специфично связывается с маркером, и обнаружении указанного антитела, где окрашивание не детектируют с помощью проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем уровень окрашивания, детектируемый при выполнении такой же процедуры с изотипически совпадающим контролем в идентичных по остальным параметрам условиях, и/или на уровне, по существу ниже, чем для клетки, которая, как известно, была положительной на маркер, и/или на уровне, по существу аналогичном по сравнению с клеткой, которая, как известно, была отрицательной на маркер.

[0497] При использовании в настоящем описании "процент (%)" идентичности аминокислотных последовательностей" и "процент идентичности", в случае использования в отношении аминокислотной последовательности (референсной полипептидной последовательности), определяется как процент аминокислотных остатков в кандидатной последовательности (например, рассматриваемого антитела или его фрагмента), которые идентичны аминокислотным остаткам в референсной полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения пропусков, если необходимо, с достижением максимального процента идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание в рамках определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может быть выполнено различными способами, которые известны специалисту в данной области, например, при использовании общедоступной компьютерной программы, такой как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, требуемые для получения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

[0498] Аминокислотная замена может включать замену одной аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой. Замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой. Аминокислотные замены могут быть введены в связывающую молекулу, например, антитело, представляющее интерес, и продукты, подвергаемые скринингу на нужную активность, например, сохраненное/улучшенное связывание антигена, сниженную иммуногенность или улучшенную активность ADCC или CDC.

[0499] Аминокислоты обычно можно разделить на группы согласно следующим общим свойствам боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0500] В некоторых вариантах осуществления консервативные замены могут включить замену члена одного из этих классов другим членом того же класса. В некоторых вариантах осуществления неконсервативные аминокислотные замены могут включать замену члена одного из этих классов другим классом.

[0501] При использовании в настоящем описании композиция относится к любой смеси двух или более продуктов, веществ или соединений, в том числе клеток. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водная, неводная или их любая комбинация.

[0502] При использовании в настоящем описании "субъект" является млекопитающим, таким как человек или другое животное, и, как правило, является человеком.

VII. ПРИМЕРЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0503] Представленные варианты осуществления включают следующее:

1. Бессывороточная среда, включающая:
от 0,5 мМ до 5 мМ дипептидной формы L-глутамин в базальной среде;
от 0,5 мМ до 5 мМ L-глутамин; и
по меньшей мере один белок, причем среда не содержит сыворотку.
2. Бессывороточная среда согласно варианту осуществления 1, где дипептидная форма L-глутамин представляет собой L-аланил-L-глутамин.
3. Бессывороточная среда согласно варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, где концентрация дипептидной формы L-глутамин составляет от или приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ, от 0,5 мМ до 4 мМ, от 0,5 мМ до 3 мМ, от 0,5 мМ до 2 мМ, от 0,5 мМ до 1 мМ, от 1 мМ до 5 мМ, от 1 мМ до 4 мМ, от 1 мМ до 3 мМ, от 1 мМ до 2 мМ, от 2 мМ до 5 мМ, от 2 мМ до 4 мМ, от 2 мМ до 3 мМ, от 3 мМ до 5 мМ, от 3 мМ до 4 мМ или от 4 мМ до 5 мМ, все включительно.
4. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-3, где концентрация дипептидной формы L-глутамин в бессывороточной среде составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ или 5 мМ.
5. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где концентрация дипептидной формы L-глутамин в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ.
6. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-5, где концентрация L-глутамин в бессывороточной среде составляет от или приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ, от 0,5 мМ до 4 мМ, от 0,5 мМ до 3 мМ, от 0,5 мМ до 2 мМ, от 0,5 мМ до 1 мМ, от 1 мМ до 5 мМ, от 1 мМ до 4 мМ, от 1 мМ до 3 мМ, от 1 мМ до 2 мМ, от 2 мМ до 5 мМ, от 2 мМ до 4 мМ, от 2 мМ до 3 мМ, от 3 мМ до 5 мМ, от 3 мМ до 4 мМ или от 4 мМ до 5 мМ, все включительно.
7. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где концентрация L-глутамин в бессывороточной среде составляет по меньшей мере или

по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ или 5 мМ.

8. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-7, где концентрация L-глутамина в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ.

9. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-8, где по меньшей мере один белок не является белком немлекопитающего происхождения.

10. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-9, где по меньшей мере один белок является человеческим белком.

11. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-10, где по меньшей мере один белок является рекомбинантным.

12. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-11, где по меньшей мере один белок включает один или более из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно одного или более из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

13. Бессывороточная среда согласно варианту осуществления 12, где по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один альбумин, где альбумин необязательно является человеческим сывороточным альбумином или является рекомбинантным человеческим альбумином, и где концентрация альбумина в среде необязательно составляет от приблизительно 2,5 мг/мл до 7,5 мг/мл.

14. Бессывороточная среда согласно варианту осуществления 13, где концентрация альбумина в бессывороточной среде составляет приблизительно 5 мг/мл.

15. Бессывороточная среда согласно варианту осуществления 12, где по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один трансферрин, где трансферрин необязательно является человеческим или является рекомбинантным человеческим альбумином, и где концентрация трансферрина в бессывороточной среде необязательно составляет от приблизительно 50 мг/л до 200 мг/л.

16. Бессывороточная среда согласно варианту осуществления 15, где концентрация трансферрина в бессывороточной среде составляет приблизительно 100 мг/л.

17. Бессывороточная среда согласно варианту осуществления 12, где по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один инсулин, где инсулин необязательно является человеческим или является рекомбинантным человеческим инсулином, и где концентрация инсулина в бессывороточной среде необязательно составляет от приблизительно 5 мг/л до 20 мг/л.

18. Бессывороточная среда согласно варианту осуществления 17, где концентрация инсулина в бессывороточной среде составляет приблизительно 10 мг/л.

19. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-18, где бессывороточная среда включает одну или более неорганических солей, сахаров, аминокислот, необязательно также содержащих витамины, органические кислоты, антиоксиданты и/или буферы.

20. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-19, где базальная среда включает среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальную поддерживающую среду (MEM), базальную среду Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальную поддерживающую среду Глазго (GMEM), альфа-модификацию минимальной поддерживающей среды (альфа-MEM), среду Дульбекко в модификации Искоува или M199.

21. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-20, где базальная среда и/или бессывороточная среда не содержит феноловый красный.

22. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-22, где бессывороточная среда включает липид, фактор роста, N-ацетилцистеин, этаноламин и/или альбумин.

23. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-22, где бессывороточная среда включает один или более цитокинов.

24. Бессывороточная среда согласно варианту осуществления 23, где один или более цитокинов выбраны из IL-2, IL-7 или IL-15.

25. Бессывороточная среда согласно любому из вариантов осуществления 1-22, где бессывороточная среда поддерживает экспансию клеток.

26. Бессывороточная среда согласно 25, где клетки являются первичными иммунными клетками.

27. Бессывороточная среда согласно варианту осуществления 25 или варианту осуществления 26, где клетки представляют собой или включают Т-клетки.

28. Бессывороточная среда согласно варианту осуществления 27, где Т-клетки включают CD4+ или CD8+ Т-клетки.

29. Базальная среда, включающая дипептидную форму L-глутамина, где базальная среда не содержит L-глутамин и белок.

30. Базальная среда согласно варианту осуществления 29, где дипептидная форма L-глутамина представляет собой L-аланил-L-глутамин.

31. Базальная среда согласно варианту осуществления 29 или варианту осуществления 30, где концентрация дипептидной формы L-глутамина составляет от или приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ, от 0,5 мМ до 4 мМ, от 0,5 мМ до 3 мМ, от 0,5 мМ до 2 мМ, от 0,5 мМ до 1 мМ, от 1 мМ до 5 мМ, от 1 мМ до 4 мМ, от 1 мМ до 3 мМ, от 1 мМ до 2 мМ, от 2 мМ до 5 мМ, от 2 мМ до 4 мМ, от 2 мМ до 3 мМ, от 3 мМ до 5 мМ, от 3 мМ до 4 мМ или от 4 мМ до 5 мМ, все включительно.

32. Базальная среда согласно любому из вариантов осуществления 29-31, где концентрация дипептидной формы L-глутамина в бессывороточной среде составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ или 5 мМ.

33. Базальная среда согласно любому из вариантов осуществления 29-32, где концентрация дипептидной формы L-глутамина в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ.

34. Базальная среда согласно любому из вариантов осуществления 29-33, где базальная среда включает одну или более неорганических солей, сахаров, аминокислот, необязательно также содержащих витамины, органические кислоты, антиоксиданты и/или буферы.

35. Базальная среда согласно любому из вариантов осуществления 29-34, включающая Среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальную поддерживающую среду (MEM), базальную среду Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальную поддерживающую среду Глазго (GMEM), альфа-модификацию минимальной поддерживающей среды (альфа-MEM), среду Дульбекко в модификации Искоува или M199.

36. Базальная среда согласно любому из вариантов осуществления 29-35, где базальная среда не содержит феноловый красный.

37. Базальная среда согласно любому из вариантов осуществления 29-36, где белок является полученным человеческим белком и/или рекомбинантным белком.

38. Базальная среда согласно любому из вариантов осуществления 29-37, которая является жидкостью.

39. Добавка, включающая по меньшей мере один белок и L-глутамин, где базальная среда для культивирования клеток в комбинации с добавкой способна поддерживать экспансию клеток.

40. Добавка согласно варианту осуществления 39, где добавка заморожена или хранится в замороженном виде до применения, необязательно при температуре от или от приблизительно -10°C до -30°C , необязательно при температуре 18°C или приблизительно 18°C или 20°C .

41. Добавка согласно варианту осуществления 39 или варианту осуществления 40, где L-глутамин в добавке не образует осадок при объединении с базальной средой и/или при размораживании добавки или воздействии на нее температуры от или от приблизительно 20°C до 42°C , необязательно от или от приблизительно 20°C до 42°C , или 37°C или больше чем или приблизительно 37°C .

42. Добавка согласно любому из вариантов осуществления 39-41, где концентрация L-глутамина в добавке составляет менее 100 мМ.

43. Добавка согласно любому из вариантов осуществления 39-42, где концентрация L-глутамина в добавке составляет от или от приблизительно 20 мМ до 100 мМ.

44. Добавка согласно любому из вариантов осуществления 39-43, где концентрация L-глутамина в добавке составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ или 90 мМ.

45. Добавка согласно любому из вариантов осуществления 39-44, где концентрация L-глутамина в добавке составляет или приблизительно составляет 80 мМ.

46. Добавка согласно любому из вариантов осуществления 39-45, где по меньшей мере один белок не является белком немлекопитающего происхождения.

47. Добавка согласно любому из вариантов осуществления 39-46, где по меньшей мере один белок является человеческим белком.

48. Добавка согласно любому из вариантов осуществления 39-47, где по меньшей мере один белок является рекомбинантным.

49. Добавка согласно любому из вариантов осуществления 39-48, где по меньшей мере один белок включает один или более из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно один или более из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

50. Добавка согласно варианту осуществления 49, где по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один альбумин, где альбумин необязательно является человеческим сывороточным альбумином или является рекомбинантным человеческим альбумином.

51. Добавка согласно варианту осуществления 49, где по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один трансферрин, где трансферрин необязательно является человеческим или является рекомбинантным человеческим трансферрином.

52. Добавка согласно варианту осуществления 49, где по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один инсулин, где инсулин необязательно является человеческим инсулином или рекомбинантным человеческим инсулином, и где концентрация инсулина в бессывороточной среде составляет от приблизительно 5 мг/л до 20 мг/л.

53. Бессывороточная среда, базальная среда или добавка, которая является стерильной.

54. Способ получения бессывороточной питательной среды, включающий объединение базальной среды согласно любому из вариантов осуществления 29-38 или 53 и добавки согласно любому из вариантов осуществления 39-53.

55. Способ получения состава бессывороточной среды, включающий комбинацию:

(a) базальной среды, включающей дипептидную форму L-глутамина, где бессывороточная базальная среда представляет собой жидкий состав и/или не была заморожена до объединения;

(b) первой добавки, включающей L-глутамин.

56. Способ согласно варианту осуществления 55, где первая добавка была заморожена до объединения, где способ необязательно включает размораживание первой добавки до объединения.

57. Способ согласно варианту осуществления 55 или 56, где концентрация дипептидной формы L-глутамина в базальной среде составляет от или приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ, от 0,5 мМ до 4 мМ, от 0,5 мМ до 3 мМ, от 0,5 мМ до 2 мМ, от 0,5 мМ до 1 мМ, от 1 мМ до 5 мМ, от 1 мМ до 4 мМ, от 1 мМ до 3 мМ, от 1 мМ до 2 мМ, от 2 мМ до 5 мМ, от 2 мМ до 4 мМ, от 2 мМ до 3 мМ, от 3 мМ до 5 мМ, от 3 мМ до 4 мМ или от 4 мМ до 5 мМ, все включительно.

58. Способ согласно любому из вариантов осуществления 55-57, где концентрация

дипептидной формы L-глутамина в базальной среде составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ или 5 мМ.

59. Способ согласно любому из вариантов осуществления 55-58, где концентрация дипептидной формы L-глутамина в составе базальной среды составляет или приблизительно составляет 2 мМ.

60. Способ согласно любому из вариантов осуществления 55-59, где дипептидная форма L-глутамина представляет собой L-аланил-L-глутамин.

61. Способ согласно любому из вариантов осуществления 55-60, где концентрация L-глутамина в добавке составляет от или от приблизительно 20 мМ до 100 мМ.

62. Способ согласно любому из вариантов осуществления 55-61, где концентрация L-глутамина в добавке составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ или 90 мМ.

63. Способ согласно любому из вариантов осуществления 55-62, где концентрация L-глутамина в добавке составляет или приблизительно составляет 80 мМ.

64. Способ согласно любому из вариантов осуществления 55-63, где первая добавка включает по меньшей мере один белок, и где по меньшей мере один присутствующий белок не является белком немлекопитающего.

65. Способ согласно любому из вариантов осуществления 55-64, где по меньшей мере один белок, присутствующий в первой добавке, включает человеческий белок.

66. Способ согласно варианту осуществления 65, где человеческий белок включает человеческий сывороточный альбумин, человеческий трансферрин и/или человеческий рекомбинантный инсулин.

67. Способ согласно любому из вариантов осуществления 54-66, где состав бессывороточной среды включает от 90% до 97,5% (об/об) базальной среды и от 1,25% до 5% (об/об) первой добавки.

68. Способ согласно любому из вариантов осуществления 54-67, где способ дополнительно включает комбинацию: (с) второй добавки, включающей один или более компонентов, выбранных из группы, состоящей из одного или более антиоксидантов, одного или более альбуминов или заменителей альбумина, одного или более липидных средств, одного или более инсулинов или заменителей инсулина, одного или более трансферринов или заменителей трансферрина, одного или более факторов роста, одного или более микроэлементов и одного или более глюкокортикоидов.

69. Способ согласно варианту осуществления 68, где вторая добавка включает липид, фактор роста, N-ацетилцистеин, этаноламин и/или альбумин.

70. Способ согласно варианту осуществления 68 или варианту осуществления 69, где состав бессывороточной среды включает от 1,25% до 5% (об/об) второй добавки.

71. Состав бессывороточной среды, полученный способом согласно любому из вариантов осуществления 54-70.

72. Состав культивирования клеток, включающий инкубацию композиции, включающей клетки, в составе бессывороточной среды согласно любому из вариантов осуществления 1-28, 53 и варианта осуществления 71.

73. Способ согласно варианту осуществления 72, где культивирование производят в соответствии с одной или более стадиями, выбранными из активации клеток в присутствии стимулятора или условия; введения средства, кодирующего гетерологичный белок, необязательно рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор необязательно является химерным антигенным рецептором; или культивирования или экспансии клеток.

74. Способ получения модифицированных клеток, включающий:

(a) контакт популяции клеток, включающей клетки, со средством, включающим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок, необязательно рекомбинантный рецептор, при условиях, обеспечивающих введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, в клетки в популяции; и

(b) инкубацию клеток в присутствии стимулирующего условия до, во время и/или после указанного контакта, где стимулирующее условие индуцирует первичный сигнал, сигнализацию, стимуляцию, активацию и/или экспансию клеток,

где один или оба из (a) и (b) проводят в составе бессывороточной среды согласно любому из вариантов осуществления 1-28, 53 и варианта осуществления 71.

75. Способ согласно любому из вариантов осуществления 72-74, где клетки являются первичными клетками.

76. Способ согласно любому из вариантов осуществления 72-75, где клетки являются иммунными клетками.

77. Способ согласно любому из вариантов осуществления 72-76, где клетки являются Т-клетками или обогащенными Т-клетками.

78. Способ согласно любому из вариантов осуществления 77, где Т-клетки или обогащенные Т-клетки являются CD4⁺ Т-клетками и/или CD8 Т-клетками.

79. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-78, где способ дополнительно включает, до (a), выделение популяции клеток из биологического образца.

80. Способ согласно варианту осуществления 79, где выделение включает отбор клеток на основе поверхностной экспрессии CD3 или на основе поверхностной экспрессии одного или обоих из CD4 и CD8, необязательно путем положительного или отрицательного отбора.

81. Способ согласно варианту осуществления 79 или варианту осуществления 80, где выделение включает проведение иммуноаффинного отбора.

82. Способ согласно любому из вариантов осуществления 79-81, где биологический образец представляет собой или включает образец цельной крови, образец лейкотромбоцитарного слоя, образец мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), нефракционированный образец Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкоафереза.

83. Способ согласно любому из вариантов осуществления 79-82, где CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки отдельно выделяют и объединяют до контакта или инкубации, необязательно объединяют в отношении от 1:2 до 2:1 CD4 к CD8 клеткам, где отношение необязательно составляет 1:1 или приблизительно 1:1.

84. Способ согласно любому из вариантов осуществления 79-82, где CD4⁺ Т-клетки выделяют и/или популяцию клеток обогащают CD4⁺ клетками.

85. Способ согласно любому из вариантов осуществления 79-83, где CD8⁺ клетки выделяют и/или популяцию клеток обогащают CD8⁺ клетками.

86. Способ согласно любому из вариантов осуществления 79-83, где суммарные Т-клетки, CD3⁺ клетки или CD4⁺ клетки и CD8⁺ клетки выделяют, и/или популяцию клеток обогащают суммарными Т-клетками, CD3⁺ клетками или CD4⁺ и CD8⁺ клетками.

87. Способ согласно любому из вариантов осуществления 79-86, где обогащенные клетки включают больше чем или больше чем приблизительно 75% 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% клеток.

88. Способ согласно любому из вариантов осуществления 72-87, где клетки являются первичными клетками, полученными у субъекта.

89. Способ согласно любому из вариантов осуществления 79-88, где стимулирующее условие включает инкубацию со стимулирующим реагентом, способным вызывать активацию 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.

90. Способ согласно варианту осуществления 89, где стимулирующий реагент включает основное средство, которое специфично связывается с членом комплекса TCR, и дополнительное средство, которое специфично связывается с Т-клеточной костимулирующей молекулой.

91. Способ согласно варианту осуществления 89 или варианту осуществления 90, где основное средство специфично связывается с CD3, и/или костимулирующая молекула выбрана из группы, состоящей из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

92. Способ согласно варианту осуществления 90 или варианту осуществления 91, где основное и дополнительное средства включают антитела и/или присутствуют на поверхности твердой подложки, необязательно сферы.

93. Способ согласно любому из вариантов осуществления 79-92, где стимуляцию клеток проводят или инициируют до контакта, необязательно в течение 18-24 часов при 37°C или приблизительно 37°C.

94. Способ согласно любому из вариантов осуществления 79-93, где стимулирующее условие включает цитокин, выбранный из IL-2, IL-15 и IL-7.

95. Способ согласно любому из вариантов осуществления 79-94, где стимуляцию клеток проводят после контакта, необязательно в течение периода времени, позволяющего достичь пороговой концентрации.

96. Способ согласно любому из вариантов осуществления 73-95, где средство,

включающее молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, является вирусным вектором, необязательно лентивирусным вектором или гаммаретровирусным вектором.

97. Способ согласно любому из вариантов осуществления 73-96, где гетерологичный белок является рекомбинантным рецептором.

98. Способ согласно варианту осуществления 97, где рекомбинантный рецептор является химерным антигенным рецептором.

99. Способ согласно любому из вариантов осуществления 72-98, где способ приводит по меньшей мере приблизительно к 5-кратной, 10-кратной, 20-кратной, 30-кратной, 40-кратной или 50-кратной или большей экспансии клеток по сравнению с количеством клеток на момент начала инкубации.

100. Способ согласно варианту осуществления 99, где экспансия клеток достигается после проведения инкубации в течение больше чем 5 дней, необязательно 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

101. Способ согласно любому из вариантов осуществления 72-100, где способ приводит к получению клеток, имеющих жизнеспособность выше чем приблизительно 80%, 85% или 90% после инкубации.

102. Способ согласно 101, где жизнеспособность существует после проведения инкубации в течение больше чем 5 дней, необязательно 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

103. Композиция клеток, полученная способом согласно любому из вариантов осуществления 72-102.

104. Изделие, включающее бессывороточную среду согласно любому из вариантов осуществления 1-28, 53 и 71; базальную среду согласно любому из вариантов осуществления 29-38 и 53; или добавку согласно любому из вариантов осуществления 39-53 и инструкции по получению или применению композиции.

105. Изделие согласно варианту осуществления 104, которое представляет собой контейнер, необязательно флакон.

VIII. ПРИМЕРЫ

[0504] Следующие примеры включены исключительно в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1: Получение модифицированных Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) в присутствии состава бессывороточной среды.

[0505] Генетически модифицированные человеческие Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), получали в присутствии состава бессывороточной среды. Модифицированную композицию первичных Т-клеток, содержащую CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR) против BCMA, получали в иллюстративном процессе, включающем отдельный отбор CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток из образца перед объединением отобранных клеток в определенном отношении для последующих стадий обработки, включающих активацию, трансдукцию и

культивирование для размножения клеток. CAR содержал scFv антигенсвязывающий домен, специфичный к BCMA, трансмембранную область CD28, костимулирующую сигнальную область 4-1BB и полученный из CD3-дзета внутриклеточный сигнальный домен.

[0506] В данном способе активацию, трансдукцию и культивирование для размножения клеток проводили в бессывороточной среде, которая была получена из: (1) жидкой базальной среды, содержащей приблизительно 2 mM L-аланил-L-глутамин (GlutaMax); (2) первой добавки, содержащей 80 mM глутамин и заменяющие сыворотку белки, которые хранили замороженными до применения; и (3) второй добавки, предоставленной в виде жидкого раствора, например, добавки OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement. Базальная среда содержала питательную смесь и буферы и не содержала феноловый красный. После размораживания замороженной добавки компоненты объединяли в количестве приблизительно 95,0% +/-0,2% (об/об) базальной среды, приблизительно 2,5% +/-0,2% (об/об) первой добавки и приблизительно 2,5% +/-0,2% (об/об) второй добавки с получением, таким образом, иллюстративной бессывороточной среды для выращивания клеток (обозначенную "SFM-A"). Присутствие L-глутамин в замороженной добавке гарантировало его стабильность до добавления в базальную среду, чтобы свести к минимуму переменную концентрацию глутамин и/или повышающуюся концентрацию аммиака в составе бессывороточной среды, который может присутствовать из-за нестабильности L-глутамин. L-глутамин оставался растворимым в первой добавке из-за присутствия L-аланил-L-глутамин. В среды дополнительно добавляли цитокины, такие как IL-2, IL-7 и/или IL-15.

[0507] Отдельные композиции CD4+ и CD8+ клеток отбирали из выделенных МКПК из человеческого образца лейкофереза, в том числе от субъектов, имеющих множественную миелому (ММ), и отобранные композиции клеток подвергали криозаморозке. Отобранные CD4+ и CD8+ композиции Т-клеток затем размораживали и смешивали в отношении 1:1 жизнеспособных CD4+ Т-клеток к жизнеспособным CD8+ Т-клеткам до выполнения стадий стимуляции, трансдукции и экспансии.

[0508] Приблизительно 300×10^6 Т-клеток (150×10^6 CD4+ и 150×10^6 CD8+ Т-клеток) из смешанной композиции клеток, при плотности приблизительно 3×10^6 клеток/мл, стимулировали в присутствии парамагнитных покрытых полистиролом сфер с прикрепленными антителами против CD3 и против CD28 в соотношении сфер к клеткам 1:1 в примерной бессывороточной среде (см., например, Пример 3). Среда также содержала рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15. Стимуляцию проводили путем инкубации в течение 18-30 часов.

[0509] После инкубации приблизительно 100×10^6 жизнеспособных клеток из стимулированной композиции клеток промывали и ресуспендировали в примерной бессывороточной среде, содержащей рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15. Вспомогательного вещества для трансдукции не добавляли. Клетки трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим CAR против BCMA, путем спинокуляции в

течение 60 минут, с последующим инкубированием в течение приблизительно 18-30 часов приблизительно при 37°C. Плотность клеток после спинокуляции составляла приблизительно 1×10^6 клеток/мл. CAR содержал scFv антигенсвязывающий домен к ВСМА, трансмембранную область CD28, костимулирующую сигнальную область 4-1BB и полученный из CD3-дзэта внутриклеточный сигнальный домен.

[0510] Затем трансдуцированные клетки культивировали для экспансии при переносе в биореактор (например, качающийся биореактор) приблизительно в 500 мл примерной бессывороточной среды, содержащей двухкратную концентрацию IL-2, IL-7 и IL-15 относительно использованной на стадиях трансдукции и инкубации. В этом примерном процессе иллюстративные среды не содержат полоксамер. После достижения пороговой плотности клеток больше чем или приблизительно $0,6 \times 10^6$ клеток/мл, в среду постепенно добавляли порции свежей среды периодически, например, от приблизительно 2 до приблизительно 15 минут до объема 1000 мл, и выращивали клетки при постоянном режиме качания (без перфузии), пока не была достигнута пороговая плотность жизнеспособных клеток больше чем или приблизительно $0,6 \times 10^6$ клеток/мл. Если плотность жизнеспособных клеток была больше $0,8 \times 10^6$ клеток/мл, начинали этап комбинированного наполнения/перфузии, в котором первую среду постепенно добавляли, как указано выше, до целевого объема 1000 мл, после чего начинали перфузию, как описано ниже. Затем среды заменяли путем полунепрерывной перфузии при непрерывном перемешивании. Скорость перфузии и/или качания увеличивали по меньшей мере один раз во время фазы экспансии при увеличении плотности клеток. Скорость перфузии увеличивали по меньшей мере один раз во время фазы экспансии при увеличении плотности клеток. Среdu постепенно добавляли к культуре в общем объеме в сутки, определяемом по плотности жизнеспособных клеток (с более высокой скоростью при достижении определенной плотности), до скорости, например, приводящей к добавлению приблизительно 750 мл или 1500 мл общего объема свежей среды к культуре в день (с более высокими скоростями при достижении более высоких концентраций клеток), с периодическим добавлением порций свежей среды в течение всего дня, например, от приблизительно одного раза каждые 0,5 и до одного раза каждые 1,5 или 2 часа. Клетки собирали через один день после того, как общее количество ядросодержащих клеток (TNC) достигало по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 3500×10^6 и в момент, в который количество TNC достигало по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 5500×10^6 суммарных ядросодержащих клеток. После сбора клеток сферы с конъюгированным антителом против CD3 и против CD28 удаляли из композиции клеток под воздействием магнитного поля. Затем клетки включали в состав и криозамораживали.

[0511] Семьдесят девять отдельных композиций модифицированных Т-клеток получали в результате примерного процесса, описанного выше. Во время культивирования наблюдали устойчивую экспансию, как определяли по общему количеству жизнеспособных клеток, после каждого из 79 производственных циклов,

включая клетки, полученные от здоровых доноров и больных множественной миеломой. Все циклы обеспечивали получение композиции клеток с плотностью клеток выше установленного порога $5,5 \times 10^9$ клеток/мл в течение 6 дней после начала культивирования. Больше чем 27-кратное увеличение количества жизнеспособных клеток наблюдали во всех производственных циклах в течение 6 дней после начала культивирования, причем больше чем в 85% циклов достигали такой экспансии в день 5. В целом, приведенные данные подтверждают стабильную эффективность состава бессывороточной среды для клеток, полученных от здоровых и больных доноров.

Пример 2: Оценка композиций CAR+ Т-клеток, полученных в процессе, включающем бессывороточную среду.

[0512] Генетически модифицированные человеческие Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), получали в присутствии иллюстративной SFM-A, по существу, как описано в Примере 1. В этом исследовании для создания CAR-экспрессирующих Т-клеток, CD4+ и CD8+ Т-клетки индивидуально выделяли путем иммуноаффинного обогащения из донорских образцов лейкофереза, смешанных в отношении приблизительно 1:1, активированных в присутствии магнитных сфер против CD3/против CD28, трансдуцированных вирусным вектором, кодирующим CAR против ВСМА, описанный в Примере 1, и культивировали при инкубировании приблизительно при 37°C для размножения клеток. Активацию, трансдукцию и культивирование для размножения клеток проводили либо в среде, содержащей 5% (об/об) человеческой сыворотки, либо в среде SFM-A, описанной в Примере 1, все в присутствии цитокинов. Примерные свойства полученных модифицированных композиций Т-клеток сравнивали между подобранными композициями клеток, полученным от того же донора, либо в присутствии SFM-A, либо в присутствии среды, содержащей сыворотку.

А. Жизнеспособность

[0513] Оценивали жизнеспособность Т-клеток после активации, после активации и трансдукции, и в каждый день после начала (день=0) культивирования до дня 6. В начале процесса, через 2 дня после начала культивирования, в клеточных композициях, культивируемых в присутствии SFM-A, наблюдали более низкие количества клеток и жизнеспособность по сравнению со средой, содержащей сыворотку. Однако к третьему дню экспансии жизнеспособность клеток, культивируемых в присутствии SFM-A и состава, содержащего сыворотку, была сопоставимой. Этот результат согласуется с задержкой роста Т-клеток в присутствии бессывороточной среды, например, когда клетки адаптируются к бессывороточным условиям на начальных стадиях процесса. Несмотря на исходное более низкое количество клеток, культура клеток в присутствии SFM-A давала несколько большее количество жизнеспособных клеток к 5 и 6 дню и сопоставимый процент жизнеспособных клеток со средой, содержащей сыворотку.

В. Активность CAR-Т-клеток

[0514] Функциональная активность CAR+ Т-клеток в композициях Т-клеток после экспансии оценивали путем контроля накопления цитокинов после стимуляции

форболмиристатацетатом (ФМА)/иономицином в присутствии ингибитора аппарата Гольджи. Многофункциональное накопление цитокинов оценивали путем внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) на IL-2, IFN-гамма и ФНО-альфа в клетках, которые были также окрашивали на поверхностные CD4, CD8 или CAR против ВСМА. Сопоставимый процент функциональных CAR⁺ CD4⁺ Т-клеток или CAR⁺ CD8⁺ Т-клеток, как было определено по многофункциональному накоплению IL-2, IFN-гамма и ФНО-альфа, наблюдали в клетках, культивируемых в присутствии SFM-A, по сравнению с клетками, культивируемыми со средой, содержащей сыворотку.

[0515] Продукцию цитокинов IL-2, IFN-гамма, ФНО-альфа и ГМ-КСФ также измеряли в супернатанте с помощью мультиплексного анализа Luminex после совместного культивирования полученных композиций CAR⁺ Т-клеток против ВСМА с антигенэкспрессирующими клетками. Секреция воспалительных цитокинов (IL-2, ФНО-альфа, ГМ-КСФ и IFN-гамма) была сопоставима для культур, полученных в присутствии SFM-A по сравнению со средой, содержащей сыворотку.

С. Апоптотический маркер

[0516] Композиции CAR⁺ Т-клеток против ВСМА, которые были получены в процессе с использованием содержащей сыворотку среды или примерной SFM-A и затем криоконсервировали и размораживали до анализа, оценивали на поверхностную экспрессию активной каспазы 3. Меньше 5% полученных модифицированных CD3⁺CAR⁺ клеток, культивируемых в присутствии SFM-A, были положительными на активную каспазу-3. Частота CD3⁺CAR⁺ клеток, которые были положительными на активную каспазу-3, была ниже в таких же композициях Т-клеток, полученных от примерного донора, при культивировании в присутствии SFM-A по сравнению со средой, содержащей сыворотку.

Д. Частота трансдукции

[0517] Частоту трансдукции полученных композиций Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии. Поверхностную экспрессию CAR против ВСМА измеряли при использовании CAR-специфичного реагента. В примерных сходных композициях донорских Т-клеток клетки, полученные в процессе, включающем SFM-A, показали повышенную эффективность трансдукции по сравнению с клетками, полученными в процессе, включающем содержащую сыворотку среду. В примерном эксперименте эффективность трансдукции была увеличена от приблизительно 53% до приблизительно 68%.

Пример 3: Противоопухолевое действие CAR-экспрессирующих Т-клеток, полученных в процессе с бессывороточной средой

[0518] Композиции CAR⁺ Т-клеток против ВСМА получали в процессе, включающем примерную SFM-A, по существу, как описано в Примере 1. В качестве сравнения, композиция Т-клеток от совпадающего донора была произведена в подобном процессе, кроме использования содержащих сыворотку сред. Противоопухолевое действие полученных CAR⁺ Т композиций оценивали путем мониторинга опухолей после

адоптивного переноса клеток в моделях на животных-опухоленосителях, включая модель диссеминированной человеческой множественной миеломы OPM2 на ксенотрансплантатных мышах.

[0519] Для создания мышей-опухоленосителей, самкам мышей NOD.Cg.Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) возрастом шесть-восемь недель вводили 2×10^6 клеток OPM2 (множественной миеломы), трансфицированных люциферазой светляка (OPM2-ffluc). Размер опухоли контролировали в день 13 с помощью биолюминесцентной визуализации и в день 14 мышам делали однократную внутривенную (в/в) инъекцию композиции CAR+ Т-клеток против BCMA, полученную в процессе, включающем SFM-A, или полученную в процессе, включающем содержащую сыворотку среды. Оцененные композиции CAR+ Т-клеток против BCMA получали от того же человека-донора. Клетки вводили в дозе 1×10^6 , 5×10^5 или $2,5 \times 10^5$ CAR-экспрессирующих Т-клеток. Клетки, не экспрессирующие CAR (пустые), использовали в качестве отрицательного контроля. Рост опухоли и выживание мышей наблюдали в течение 100 дней после введения клеток.

[0520] Противоопухолевую активность адоптивно перенесенных CAR-экспрессирующих клеток контролировали с помощью биолюминесцентной визуализации в разные дни после инъекции CAR-Т-клеток до 100 дней. Для биолюминесцентной визуализации мышам делали внутрибрюшинные (в/б) инъекции субстрата люциферина (CaliperLife Sciences, Hopkinton, MA), ресуспендированного в PBS (15 мкг/г массы тела). Мышей анестезировали и визуализировали по существу, как описано в WO 2015/095895. Общий световой поток (фотон/с) определяли в каждой точке времени. В случае мышей, получавших отрицательный контроль, животных умерщвляли между 22 и 26 днями после переноса CAR-Т из-за высокой опухолевой нагрузки. CAR-экспрессирующие Т-клетки, полученные либо с SFM-A, либо с содержащей сыворотку средой, замедляли рост опухоли и продлевали выживаемость, что в целом было сопоставимо при всех оцененных дозах.

Пример 4: Оценка составов бессывороточной среды в двухпоточном процессе получения модифицированных CD4+ и CD8+ Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR)

[0521] Генетически модифицированные человеческие Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), получали в процессе, в котором отдельные композиции CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток подвергали стадиям способа отдельно. Отдельные композиции CD4+ и CD8+ клеток отбирали из МКПК, выделенных из образцов лейкофереза человека, и подвергали криозаморозке. Отобранные композиции CD4+ и CD8+ затем размораживали и отдельно стимулировали в присутствии парамагнитных, покрытых полистиролом сфер с прикрепленными антителами против CD3 и против CD28, отдельно трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим CAR, и культивировали при температуре приблизительно 37°C для размножения клеток. Каждую из отдельных стадий активации, трансдукции и культивирования проводили в присутствии SFM-A, как описано в Примере 1, или в содержащей сыворотки среде. В

SFM-A или содержащую сыворотку среду дополнительно добавляли цитокины. Полученные CD4⁺ и CD8⁺ CAR-T-клетки смешивали 1:1 до оценки клеток в функциональных анализах *in vitro*. Примерные свойства полученных композиций модифицированных Т-клеток сравнивали.

А. Апоптотический маркер

[0522] Кριοконсервированные композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток, полученные, как обычно описано выше, размораживали и затем культивировали в течение до 48 часов. Кинетическое количественное определение каспазы 3/7 выполняли путем инкубации клеток с субстратом, содержащим мотив узнавания для каспазы 3/7, слитый с флуоресцентной молекулой для визуализации и количественного определения апоптоза в зависимости от времени.

[0523] При всех условиях композиции CAR-T-клеток, полученные в присутствии SFM-A, имели более низкое окрашивание на каспазу 3/7 по сравнению с композициями Т-клеток, полученными с содержащей сыворотку средой, в ходе кинетической оценки. Эти результаты согласовываются с наблюдением, что композиция Т-клеток, полученная с примерной SFM-A, может быть более здоровой и иметь улучшенную жизнеспособность.

В. Продукция цитокинов

[0524] Для оценки антигензависимой активности полученной композиции CAR+ Т-клеток, полученные композиции Т-клеток культивировали в течение 24 часов с клетками-мишенями, трансдуцированными антигеном, распознаваемым CAR или исходными (нетрансдуцированными) клетками, не экспрессирующими антиген. Секрецию цитокинов IL-2, IFN-гамма и ФНО-альфа измеряли в супернатанте с помощью мультиплексного анализа Luminesx. Уровни цитокинов, измеренные в супернатанте после антигенспецифической стимуляции, были сопоставимыми для CAR-экспрессирующих Т-клеток, полученных в SFM-A, по сравнению со средой, содержащей сыворотку. Никакой продукции цитокинов не наблюдали в композиции Т-клеток от того же донора, не экспрессирующих CAR.

С. Цитотоксичность в отношении клеток-мишеней.

[0525] Композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток, полученных в SFM-A или содержащей сыворотку среде, оценивали на функцию цитотоксического действия против клеток-мишеней. Экспрессирующие антиген клетки-мишени совместно культивировали с композициями CAR-T-клеток при соотношении эффектора к клетке-мишени (Е:Т) 3:1 или 1:1. Лизис клеток оценивали путем добавления флуоресцентного реагента на каспазу 3/7 к сокультурам и количественно определяли лизис клеток-мишеней с помощью автоматизированного анализа изображения. Определяли площадь под кривой (AUC) флуоресцентного сигнала. Индекс цитотоксичности определяли по формуле: 1/AUC. Улучшенное цитотоксическое действие против клеток-мишеней наблюдали для CAR-T-клеток, полученных с SFM-A, по сравнению с CAR-T-клетками, полученными с содержащей сыворотку средой, в отношениях Е:Т 3:1 и 1:1.

Д. Экспансия

[0526] Композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток, полученные в SFM-A или содержащей сыворотку среде, оценивали по экспансии Т-клеток в ответ на антиген. Кριοконсервированные композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток, полученные, как описано выше, размораживали и затем совместно культивировали с антиген-экспрессирующими клетками-мишенями. В день 4 сокультуры, экспансию Т-клеток оценивали путем подсчета количеств клеток. Улучшенную экспансию наблюдали для CAR-Т-клеток, полученных с SFM-A, по сравнению с CAR-Т-клетками, полученными с содержащей сыворотку средой.

Пример 5. Оценка композиций Т-клеток, полученных в примерах производственных процессов с бессывороточной средой

[0527] В примерном процессе по существу, как описано в Примере 1, 50 композиций CAR+ Т-клеток, содержащих аутологичные Т-клетки, экспрессирующие CAR против ВСМА, были получены из образцов афереза, собранных у 50 отдельных субъектов-людей (один аферез от каждого субъекта), включающих 10 здоровых доноров и 40 больных множественной миеломой. CD4+ и CD8+ Т-клетки отбирали из образцов афереза и отдельно кριοконсервировали. Затем клетки размораживали и CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки объединяли в отношении 1:1 жизнеспособных CD4+ к CD8+ клеткам. Объединенные CD4+ и CD8+ Т-клетки активировали, трансдуцировали вектором, кодирующим CAR, размножали и замораживали путем кριοконсервации, по существу, как описано в Примере 1.

[0528] В примерном альтернативном процессе композиции терапевтических Т-клеток получали в процессе, включающем иммуноаффинный отбор Т-клеток из образцов лейкоафереза 55 отдельных субъектов-людей с раком. Суммарные Т-клетки подвергали активации и трансдукции вирусным вектором, кодирующим CAR, экспансии и кριοконсервации.

[0529] Клетки в замороженных композициях размораживали и оценивали с помощью проточной цитометрии на жизнеспособность, экспрессию апоптотического маркера, такого как активная каспаза 3 (CAS)), поверхностную экспрессию CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CCR7 и CD45RA, и CAR. Определяли процент CD3+ клеток, процент CAR+ отрицательных на апоптотический маркер клеток в CD3+CAR+ клетках в композициях и процент CD4+CAR+ клеток центральной памяти и CD8+CAR+ клеток центральной памяти в композициях. Оценивали фенотипы клеток в композициях клеток, полученных в процессе производства, и, в некоторых аспектах, сравнивали с такими показателями композиций клеток, полученных в альтернативном процессе.

[0530] Процесс производства данного примера приводил к получению композиций модифицированных клеток, удовлетворяющих некоторым заданным характеристикам, включающим пороговые количества клеток, экспрессирующих CAR, в композиции клеток, вводимой пациентам, в 100% человеческих биологических образцов, с которыми его проводили. На **ФИГ. 1А** и **1В** показана медиана (горизонтальные линии), межквартильный размах (ящик) и 1,5× межквартильный размах (усы) для процентов

клеток обозначенных фенотипов (на основе поверхностной экспрессии CD45RA и CCR7), из CD4+CAR+ клеток (**ФИГ. 1А**) и из CD8+CAR+ клеток (**ФИГ. 1В**) в композициях, соответственно, для композиций, индивидуально полученных из группы образцов 40 субъектов с множественной миеломой. На **ФИГ. 1С** и **1D** показана медиана (горизонтальные линии), межквартильный размах (ящик) и 1,5х межквартильный размах (усы) для процентов клеток обозначенных фенотипов (на основе поверхностной экспрессии CD27 и CD28), из CD4+CAR+ клеток (**ФИГ. 1С**) и из CD8+CAR+ клеток (**ФИГ. 1D**)) в композициях, соответственно, для композиций, индивидуально полученных из группы образцов 40 субъектов с множественной миеломой. Для отдельных образцов лейкофереза, полученных у группы пациентов с множественной миеломой, с использованием этого примерного процесса для получения композиций модифицированных клеток из таких образцов, отмечали, что диапазон длительности части процесса от начала активации до сбора клеток составлял от 7 до 10 дней, и средняя длительность для этих образцов составляла приблизительно 7,5 дней. Было также определено, что среднее количество совокупных удвоений популяции в течение процесса для различных образцов составило приблизительно 7,5.

[0531] В этом исследовании популяции модифицированных Т-клеток в композициях клеток, полученных в примерном процессе, включали меньше 15% клеток, экспрессирующих апоптотический маркер, и были обогащены фенотипом центральной памяти по сравнению с исходными образцами и композициями клеток, полученных с использованием примерного альтернативного процесса.

[0532] Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными раскрытыми вариантами осуществления, которые предоставлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из описания и представленных в настоящем описании идей. Такие вариации могут быть осуществлены на практике без отступления от истинного объема и сущности изобретения и должны быть включены в объем настоящего изобретения.

Последовательности

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ОПИСАНИЕ
1	ESKYGPPCPPCP	спейсер (шарнирная область IgG4) (ак)
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	спейсер (шарнирная область IgG4) (нт)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Шарнирная область-С _H 3 спейсер
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLTQDNLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Шарнирная область-С _H 2-С _H 3 спейсер

5	RWPESPKAQASSVPTAQPPAEGSLAKATTAPATTRNTGRG GEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQD LWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEG LLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQR LMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSP PNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRV PAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH	IgD-шарнирная область-Fc
6	LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR	T2A
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINAT NIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKT VKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLA VVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLF GTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRD CVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLP QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENN TLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIP SIATGMVGALLLLL VVALGIGLFM	tEGFR
8	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 153-179 из рег. номера P10747)
9	IEVMYPPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 114-179 из рег. номера P10747)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR S	CD28 (аминокислоты 180-220 из P10747)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR S	CD28 (LL→GG)
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCE L	4-1BB (аминокислоты 214-255 из Q07011.1)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3-дзета
14	RVKFSRSAEPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3-дзета
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3-дзета
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAF RGDSFTHTPPLDPQELDILKT VKEITGFLLIQAWPENRTDLH AFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATG QVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHY IDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC TYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLL VVALGIGL FM	tEGFR
17	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A

21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGGG)5-P-, где P - пролин, G - глицин, и S - серин	Линкер
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	Линкер
24	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctcctgatccca	Сигнальная последовательность альфа-цепи GMCSFR
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	Сигнальная последовательность альфа-цепи GMCSFR
26	MALPVTALLLPLALLHA	Сигнальный пептид CD8 альфа
27	EVQLVQSGAEMKKPGASLKLSCKASGYTFIDYYVYWMRQ APGQGLESMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSSDDTAMYYCARSQRDGYMDYWGQGTLLTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи (V_H) антитела против BCMA
28	QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQHPGKAPK LMIYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYY CSSNTRSSSTLVFGGGTKLTVLG	Вариабельная область легкой цепи (V_L) антитела против BCMA
29	ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Шарнирная область- C_H2-C_H3 спейсер Homo sapiens
30	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAP GKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYL QINNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSTVTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи (V_H) антитела против BCMA
31	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQ KPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEED DVAVYYCLQSRTPRTFGGGTKLEIK	Вариабельная область легкой цепи (V_L) антитела против BCMA
32	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFTNFGMNWVKQA PGKGFKWMWINTYTGESYFADDFKGRFAFSVETSATTAY LQINNLYKTEDTATYFCARGEIYYGYDGGFAYWGQGTLLTV SA	Вариабельная область тяжелой цепи (V_H) антитела против BCMA
33	DVVMVTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDVNTAVSWYQQKP GQSPKLLIFSASYRYTGVPDRFTGSGSGADFTLTISVQAED LAVYYCQQHYSTPWTFGGGKLDIK	Вариабельная область легкой цепи (V_L) антитела против BCMA
34	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGIYPGDSDFRYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARYSGSFDNWGQGTLLTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи (V_H) антитела против BCMA
35	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVNHWYQQLP GTAPKLLIYTNNQRPSGVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSED EADYYCAAWDGSNLGLVFGGGTKLTVLG	Вариабельная область легкой цепи (V_L) антитела против BCMA
36	GGGGS	Линкер
37	GGGS	Линкер

38	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер
39	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер
40	SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA	Линкер
41	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAP GQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDYME LSSLRSEDYAVYYCARSGYSKIVSYMDYWGQGLTVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (V _H) антитела против BCMA
42	LPVLTQPPSTSGTPGQRVTVSCSGSSSNIGSNVFWYQQLPG TAPKLVIIYRNNQRPSGVPDRFSVSKSGTSASLAISGLRSEDE ADYYCAAWDDSLSGYVFGTGTKVTVLG	Варибельная область легкой цепи (V _L) антитела против BCMA
43	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQA PGQGLEWMGRIIPILGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDYAVYYCARSGYGSYRWEDSWGQGLTVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (V _H) антитела против BCMA
44	QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNVFWYQQLPG TAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEA DYCAAWDDSLSASVYVFGTGTKVTVLG	Варибельная область легкой цепи (V _L) антитела против BCMA
45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYYMHWRQ APGQRLEWMGWPNPNSGGTNYAQKFQDRITVTRDTSSNTG YMELTRLRSDDYAVYYCARSPYSGVLDKWGQGLTVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (V _H) антитела против BCMA
46	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGFDVHWYQQLP GTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED EADYYCQSYDSSLSGYVFGTGTKVTVLG	Варибельная область легкой цепи (V _L) антитела против BCMA
47	RASQDISKYLN	CDR L1
48	SRLHSGV	CDR L2
49	GNTLPYTFG	CDR L3
50	DYGVS	CDR H1
51	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
52	YAMDYWG	CDR H3
53	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPR KGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKVFLKMN SLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSS	VH
54	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT	VL
55	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGE VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPR KGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKVFLKMN SLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSS	scFv
56	KASQNVGTNVA	CDR L1
57	SATYRNS	CDR L2
58	QQYNRYPYT	CDR L3
59	SYWMN	CDR H1
60	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
61	KTISSVVDYFDY	CDR H3

62	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAY MQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDIFYFDYWGQGTTVTVS S	VH
63	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKP GQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKD LADYFCQQYNRYPYTSGGGGTKLEIKR	VL
64	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер
65	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAY MQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDIFYFDYWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKA SQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGS GSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGGTKLEI KR	scFv
66	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
67	HTSRLHS	LC-CDR2
68	QQGNTLPYT	LC-CDR3
69	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgcagcctgggcgaccgggtgacca tcagctgccgggccagccaggacatcagcaagtacctgaactggatcagcagaagcccgac ggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgccagccgggt tagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgacctctccaacctggaacaggaagata tcgccacctacttttgccagcagggcaacacactgccctacacctttggcggcgaacaaagc tggaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcagcacca agggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggccccagccagagcctga gcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccgactacggcgtgagctggatccggca gccccccaggaaggcctggaatggctgggcgtgatctggggcagcgagaccacctactac aacagcgcctgaagagccggctgacctatcaaggacaacagcaagagccaggtgttct gaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactacta cggcggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgacctgagcagc	Последовательность, кодирующая scFv
70	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	линкер

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Бессывороточная среда, включающая:
от 0,5 мМ до 5 мМ дипептидной формы L-глутамина в базальной среде;
от 0,5 мМ до 5 мМ L-глутамин; и
по меньшей мере один белок, причем среда не содержит сыворотку.
2. Бессывороточная среда по п.1, где дипептидная форма L-глутамин представляет собой L-аланил-L-глутамин.
3. Бессывороточные среды по п.1 или по п.2, где концентрация дипептидной формы L-глутамин от или приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ, от 0,5 мМ до 4 мМ, от 0,5 мМ до 3 мМ, от 0,5 мМ до 2 мМ, от 0,5 мМ до 1 мМ, от 1 мМ до 5 мМ, от 1 мМ до 4 мМ, от 1 мМ до 3 мМ, от 1 мМ до 2 мМ, от 2 мМ до 5 мМ, от 2 мМ до 4 мМ, от 2 мМ до 3 мМ, от 3 мМ до 5 мМ, от 3 мМ до 4 мМ или от 4 мМ до 5 мМ, все включительно.
4. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-3, где концентрация дипептидной формы L-глутамин в бессывороточной среде составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ или 5 мМ.
5. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-4, где концентрация дипептидной формы L-глутамин в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ.
6. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-5, где концентрация L-глутамин в бессывороточной среде составляет от или приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ, от 0,5 мМ до 4 мМ, от 0,5 мМ до 3 мМ, от 0,5 мМ до 2 мМ, от 0,5 мМ до 1 мМ, от 1 мМ до 5 мМ, от 1 мМ до 4 мМ, от 1 мМ до 3 мМ, от 1 мМ до 2 мМ, от 2 мМ до 5 мМ, от 2 мМ до 4 мМ, от 2 мМ до 3 мМ, от 3 мМ до 5 мМ, от 3 мМ до 4 мМ или от 4 мМ до 5 мМ, все включительно.
7. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-6, где концентрация L-глутамин в бессывороточной среде составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ или 5 мМ.
8. Бессывороточная среда по любому из пп.1-7, где концентрация L-глутамин в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ.
9. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-8, где по меньшей мере один белок не является белком немлекопитающего происхождения.
10. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-9, где по меньшей мере один белок является человеческим белком.
11. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-10, где по меньшей мере один белок является рекомбинантным.
12. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-11, где по меньшей мере один белок включает один или более из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно один или более из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

13. Бессывороточная среда по п.12, где по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один альбумин, где альбумин необязательно является человеческим сывороточным альбумином или является рекомбинантным человеческим альбумином, и где концентрация альбумина в среде необязательно составляет от приблизительно 2,5 мг/мл до 7,5 мг/мл.

14. Бессывороточная среда по п.13, где концентрация альбумина в бессывороточной среде составляет приблизительно 5 мг/мл.

15. Бессывороточная среда по п.12, где по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один трансферрин, необязательно где трансферрин является человеческим или является рекомбинантным человеческим трансферрином, и где концентрация трансферрина в бессывороточной среде необязательно составляет от приблизительно 50 мг/л до 200 мг/л.

16. Бессывороточная среда по п.15, где концентрация трансферрина в бессывороточной среде составляет приблизительно 100 мг/л.

17. Бессывороточная среда по п.12, где по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один инсулин, где инсулин необязательно является человеческим или является рекомбинантным человеческим инсулином, и где концентрация инсулина в бессывороточной среде необязательно составляет от приблизительно 5 мг/л до 20 мг/л.

18. Бессывороточная среда по п.17, где концентрация инсулина в бессывороточной среде составляет приблизительно 10 мг/л.

19. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-18, где бессывороточная среда включает одну или более неорганических солей, сахаров, аминокислот, необязательно также содержащих витамины, органические кислоты, антиоксиданты и/или буферы.

20. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-19, где базальная среда включает среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальную поддерживающую среду (MEM), базальную среду Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальную поддерживающую среду Глазго (GMEM), альфа-модификацию минимальной поддерживающей среды (альфа-MEM), среду Дульбекко в модификации Искоува или M199.

21. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-20, где базальная среда и/или бессывороточная среда не содержит феноловый красный.

22. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-21, где бессывороточная среда включает липид, фактор роста, N-ацетилцистеин, этаноламин и/или альбумин.

23. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-22, где бессывороточная среда включает один или более цитокинов.

24. Бессывороточная среда по п.23, где один или более цитокинов выбраны из IL-2, IL-7 или IL-15.

25. Бессывороточная среда по любому из пп. 1-22, где бессывороточная среда поддерживает экспансию клеток.

26. Бессывороточная среда 25, где клетки являются первичными иммунными

клетками.

27. Бессывороточная среда по п.25 или по п.26, где клетки представляют собой или включают Т-клетки.

28. Бессывороточная среда по п.27, где Т-клетки включают CD4+ или CD8+ Т-клетки.

29. Базальная среда, включающая дипептидную форму L-глутамина, где базальная среда не содержит L-глутамин и белок.

30. Базальная среда по п.29, где дипептидная форма L-глутамина представляет собой L-аланил-L-глутамин.

31. Базальная среда по п.29 или по п.30, где концентрация дипептидной формы L-глутамина составляет от или приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ, от 0,5 мМ до 4 мМ, от 0,5 мМ до 3 мМ, от 0,5 мМ до 2 мМ, от 0,5 мМ до 1 мМ, от 1 мМ до 5 мМ, от 1 мМ до 4 мМ, от 1 мМ до 3 мМ, от 1 мМ до 2 мМ, от 2 мМ до 5 мМ, от 2 мМ до 4 мМ, от 2 мМ до 3 мМ, от 3 мМ до 5 мМ, от 3 мМ до 4 мМ или от 4 мМ до 5 мМ, все включительно.

32. Базальная среда по любому из пп. 29-31, где концентрация дипептидной формы L-глутамина в бессывороточной среде составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ или 5 мМ.

33. Базальная среда по любому из пп. 29-32, где концентрация дипептидной формы L-глутамина в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ.

34. Базальная среда по любому из пп. 29-33, где базальная среда включает одну или более неорганических солей, сахаров, аминокислот, необязательно также содержащих витамины, органические кислоты, антиоксиданты и/или буферы.

35. Базальная среда по любому из пп. 29-34, включающая среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальную поддерживающую среду (MEM), базальную среду Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальную поддерживающую среду Глазго (GMEM), альфа-модификацию минимальной поддерживающей среды (альфа-MEM), среду Дульбекко в модификации Искоува или M199.

36. Базальная среда по любому из пп. 29-35, где базальная среда не содержит феноловый красный.

37. Базальная среда по любому из пп. 29-36, где белок является человеческим белком и/или рекомбинантным белком.

38. Базальная среда по любому из пп. 29-37, где базальная среда является жидкостью.

39. Добавка, включающая по меньшей мере один белок и L-глутамин, где базальная среда для культивирования клеток, объединенная с добавкой, способна поддерживать экспансию клеток.

40. Добавка по п.39, где добавку замораживают или хранят в замороженном виде до применения, необязательно при температуре от или от приблизительно -10°C до -30°C, необязательно от или от приблизительно 18°C или 20°C.

41. Добавка по п.39 или по п.40, где L-глутамин в добавке не образует осадок при объединении с базальной средой и/или при размораживании добавки или воздействии температуры от или от приблизительно 20°C до 42°C, необязательно от или от приблизительно 20°C до 42°C или температуры 37°C или больше чем или приблизительно 37°C.

42. Добавка по любому из пп. 39-41, где концентрация L-глутамина в добавке составляет меньше 100 мМ.

43. Добавка по любому из пп. 39-42, где концентрация L-глутамина в добавке составляет от или от приблизительно 20 мМ до 100 мМ.

44. Добавка по любому из пп. 39-43, где концентрация L-глутамина в добавке составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ или 90 мМ.

45. Добавка по любому из пп. 39-44, где концентрация L-глутамина в добавке составляет или приблизительно составляет 80 мМ.

46. Добавка по любому из пп. 39-45, где по меньшей мере один белок не является белком немлекопитающего происхождения.

47. Добавка по любому из пп. 39-46, где по меньшей мере один белок является человеческим белком.

48. Добавка по любому из пп. 39-47, где по меньшей мере один белок является рекомбинантным.

49. Добавка по любому из пп. 39-48, где по меньшей мере один белок включает один или более белков из числа альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно один или более белков из числа человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

50. Добавка по п.49, где по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один альбумин, где альбумин необязательно является человеческим сывороточным альбумином или является рекомбинантным человеческим альбумином.

51. Добавка по п.49, где по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один трансферрин, где трансферрин необязательно является человеческим или является рекомбинантным человеческим трансферрином.

52. Добавка по п.49, где по меньшей мере один белок включает по меньшей мере один инсулин, где инсулин необязательно является человеческим инсулином или рекомбинантным человеческим инсулином, и где концентрация инсулина в бессывороточной среде составляет от приблизительно 5 мг/л до 20 мг/л.

53. Бессывороточная среда, базальная среда или добавка, которые являются стерильными.

54. Способ получения бессывороточной питательной среды, включающий комбинацию базальной среды по любому из пп. 29-38 или 53 и добавки по любому из пп. 39-53.

55. Способ получения состава бессывороточной среды, включающий комбинацию:

(а) базальной среды, включающей дипептидную форму L-глутамин, где бессывороточная базальная среда является жидким составом и/или не была заморожена до объединения;

(b) первой добавки, включающей L-глутамин.

56. Способ по п.55, где первая добавка была заморожена до объединения, где способ необязательно включает размораживание первой добавки до объединения.

57. Способ по п.55 или 56, где концентрация дипептидной формы L-глутамин в базальной среде составляет от или приблизительно от 0,5 мМ до 5 мМ, от 0,5 мМ до 4 мМ, от 0,5 мМ до 3 мМ, от 0,5 мМ до 2 мМ, от 0,5 мМ до 1 мМ, от 1 мМ до 5 мМ, от 1 мМ до 4 мМ, от 1 мМ до 3 мМ, от 1 мМ до 2 мМ, от 2 мМ до 5 мМ, от 2 мМ до 4 мМ, от 2 мМ до 3 мМ, от 3 мМ до 5 мМ, от 3 мМ до 4 мМ или от 4 мМ до 5 мМ, все включительно.

58. Способ по любому из пп. 55-57, где концентрация дипептидной формы L-глутамин в базальной среде составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ или 5 мМ.

59. Способ по любому из пп. 55-58, где концентрация дипептидной формы L-глутамин в составе базальной среды составляет или приблизительно составляет 2 мМ.

60. Способ по любому из пп. 55-59, где дипептидная форма L-глутамин представляет собой L-аланил-L-глутамин.

61. Способ по любому из пп. 55-60, где концентрация L-глутамин в добавке составляет от или от приблизительно 20 мМ до 100 мМ.

62. Способ по любому из пп. 55-61, где концентрация L-глутамин в добавке составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или составляет или приблизительно составляет 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ или 90 мМ.

63. Способ по любому из пп. 55-62, где концентрация L-глутамин в добавке составляет или приблизительно составляет 80 мМ.

64. Способ по любому из пп. 55-63, где первая добавка включает по меньшей мере один белок, и где по меньшей мере один присутствующий белок не является белком немлекопитающего происхождения.

65. Способ по любому из пп. 55-64, где по меньшей мере один белок, присутствующий в первой добавке, включает человеческий белок.

66. Способ по п.65, где человеческий белок включает человеческий сывороточный альбумин, человеческий трансферрин и/или человеческий рекомбинантный инсулин.

67. Способ по любому из пп. 54-66, где состав бессывороточной среды включает от 90% до 97,5% (об/об) базальной среды и от 1,25% до 5% (об/об) первой добавки.

68. Способ по любому из пп. 54-67, где способ дополнительно включает комбинацию (с) второй добавки, включающей один или более компонентов, выбранных из группы, состоящей из одного или более антиоксидантов, одного или более альбуминов или заменителей альбумина, одного или более липидных средств, одного или более инсулинов или заменителей инсулина, одного или более трансферринов или заменителей

трансферрина, одного или более факторов роста, одного или более микроэлементов и одного или более глюкокортикоидов.

69. Способ по п.68, где вторая добавка включает липид, фактор роста, N-ацетилцистеин, этаноламин и/или альбумин.

70. Способ по п.68 или по п.69, где состав бессывороточной среды включает от 1,25% до 5% (об/об) второй добавки.

71. Состав бессывороточной среды, полученный способом по любому из пп. 54-70.

72. Способ культивирования клеток, включающий инкубацию композиции, включающей клетки, в составе бессывороточной среды по любому из пп. 1-28, 53 и по п.71.

73. Способ по п.72, где культивирование проводят в сочетании с одной или более стадиями, выбранными из активации клеток в присутствии стимулятора или условия; введения средства, кодирующего гетерологичный белок, необязательно рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор необязательно является химерным антигенным рецептором; или культивирования или экспансии клеток.

74. Способ получения модифицированных клеток, включающий:

(а) контакт популяции клеток, включающей клетки, со средством, включающим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок, необязательно рекомбинантный рецептор, при условиях, обеспечивающих введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, в клетки в популяции; и

(b) инкубацию клеток в присутствии стимулирующего условия до, во время и/или после указанного контакта, где стимулирующее условие индуцирует первичный сигнал, стимуляцию сигнализации, активацию и/или экспансию клеток,

где одну или обе из стадий (а) и (b) осуществляют в составе бессывороточной среды по любому из пп. 1-28, 53 и п.71.

75. Способ по любому из пп. 72-74, где клетки являются первичными клетками.

76. Способ по любому из пп. 72-75, где клетки являются иммунными клетками.

77. Способ по любому из пп. 72-76, где клетки являются Т-клетками или обогащены Т-клетками.

78. Способ по п.77, где Т-клетки или обогащенные Т-клетки являются CD4+ Т-клетками и/или CD8 Т-клетками.

79. Способ по любому из пп. 74-78, где способ дополнительно включает, до (а), выделение популяции клеток из биологического образца.

80. Способ по п.79, где выделение включает отбор клеток на основе поверхностной экспрессии CD3 или на основе поверхностной экспрессии одного или обоих из CD4 и CD8, необязательно путем положительного или отрицательного отбора.

81. Способ по п.79 или по п.80, где выделение включает проведение иммуноаффинного отбора.

82. Способ по любому из пп. 79-81, где биологический образец представляет собой или включает образец цельной крови, образец лейкоцитомоноцитарного слоя, образец

моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), нефракционированный образец Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкоафереза.

83. Способ по любому из пп. 79-82, где CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки отдельно выделяют и объединяют до контакта или инкубации, необязательно объединяют в отношении от 1:2 до 2:1 CD4 к CD8 клеткам, где отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1.

84. Способ по любому из пп. 79-82, где CD4⁺ Т-клетки выделены, и/или популяция клеток обогащена CD4⁺ клетками.

85. Способ по любому из пп. 79-83, где CD8⁺ клетки выделены, и/или популяция клеток обогащена CD8⁺ клетками.

86. Способ по любому из пп. 79-83, где суммарные Т-клетки, CD3⁺ клетки или CD4⁺ клетки и CD8⁺ клетки выделены, и/или популяция клеток обогащена суммарными Т-клетками, CD3⁺ клетками или CD4⁺ и CD8⁺ клетками.

87. Способ по любому из пп. 79-86, где обогащенные клетки включают больше чем или больше чем приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% клеток.

88. Способ по любому из пп. 72-87, где клетки являются первичными клетками, полученными у субъекта.

89. Способ по любому из пп. 79-88, где стимулирующее условие включает инкубацию со стимулирующим реагентом, способным 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.

90. Способ по п.89, где стимулирующий реагент включает основное средство, которое специфично связывается с членом комплекса TCR, и дополнительное средство, которое специфично связывается с Т-клеточной костимулирующей молекулой.

91. Способ по п.89 или по п.90, где основное средство специфично связывается с CD3, и/или костимулирующая молекула выбрана из группы, состоящей из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

92. Способ по п.90 или по п.91, где основное и дополнительное средства включают антитела и/или присутствуют на поверхности твердой подложки, необязательно сферы.

93. Способ по любому из пп. 79-92, где стимуляцию клеток проводят или инициируют до контакта, необязательно в течение 18-24 часов при или приблизительно при 37°C.

94. Способ по любому из пп. 79-93, где стимулирующее условие включает цитокин, выбранный из IL-2, IL-15 и IL-7.

95. Способ по любому из пп. 79-94, где стимуляцию клеток проводят после контакта, необязательно в течение периода времени, требуемого для достижения пороговой концентрации.

96. Способ по любому из пп. 73-95, где средство, включающее молекулу

нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, является вирусным вектором, необязательно лентивирусным вектором или гаммаретровирусным вектором.

97. Способ по любому из пп. 73-96, где гетерологичный белок является рекомбинантным рецептором.

98. Способ по п.97, где рекомбинантный рецептор является химерным антигенным рецептором.

99. Способ по любому из пп. 72-98, где способ приводит по меньшей мере к приблизительно 5-кратной, 10-кратной, 20-кратной, 30-кратной, 40-кратной или 50-кратной или большей экспансии клеток по сравнению с количеством клеток в начале инкубации.

100. Способ по п.99, где экспансия клеток достигается после проведения инкубации в течение больше чем 5 дней, необязательно 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

101. Способ по любому из пп. 72-100, где способ приводит к получению клеток, имеющих жизнеспособность выше чем приблизительно 80%, 85% или 90% после инкубации.

102. Способ по п.101, где жизнеспособность присутствует после проведения инкубации в течение больше чем 5 дней, необязательно 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

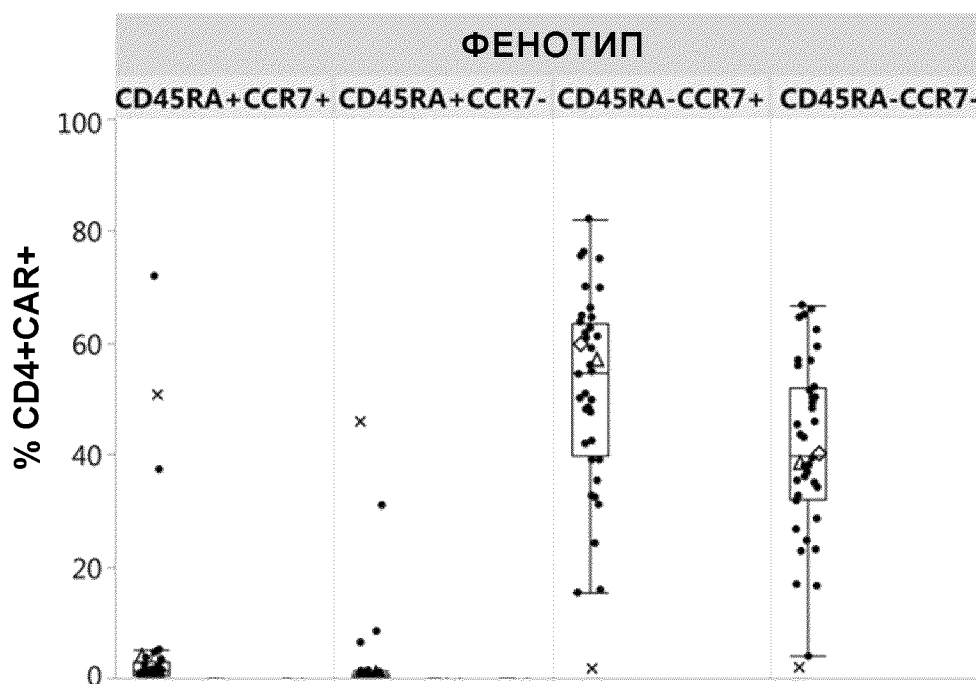
103. Композиция клеток, полученная способом по любому из пп. 72-102.

104. Изделие, включающее бессывороточную среду по любому из пп. 1-28, 53 и 71; базальную среду по любому из пп. 29-38 и 53; или добавку по любому из пп. 39-53, и инструкции по получению или применению композиции.

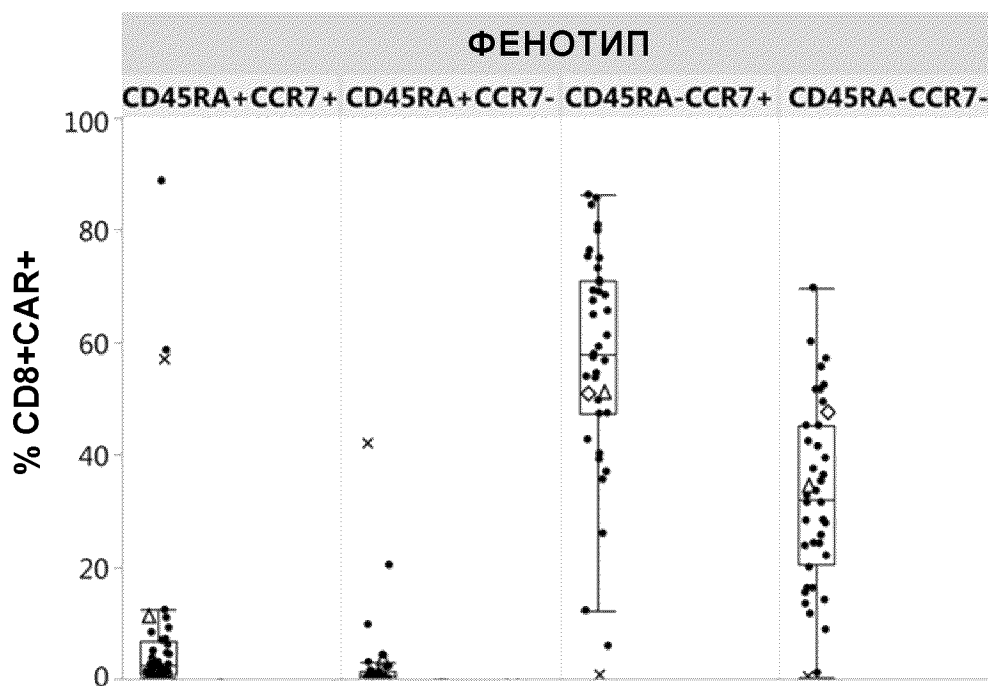
105. Изделие по п.104, которое представляет собой контейнер, необязательно бутылку.

По доверенности

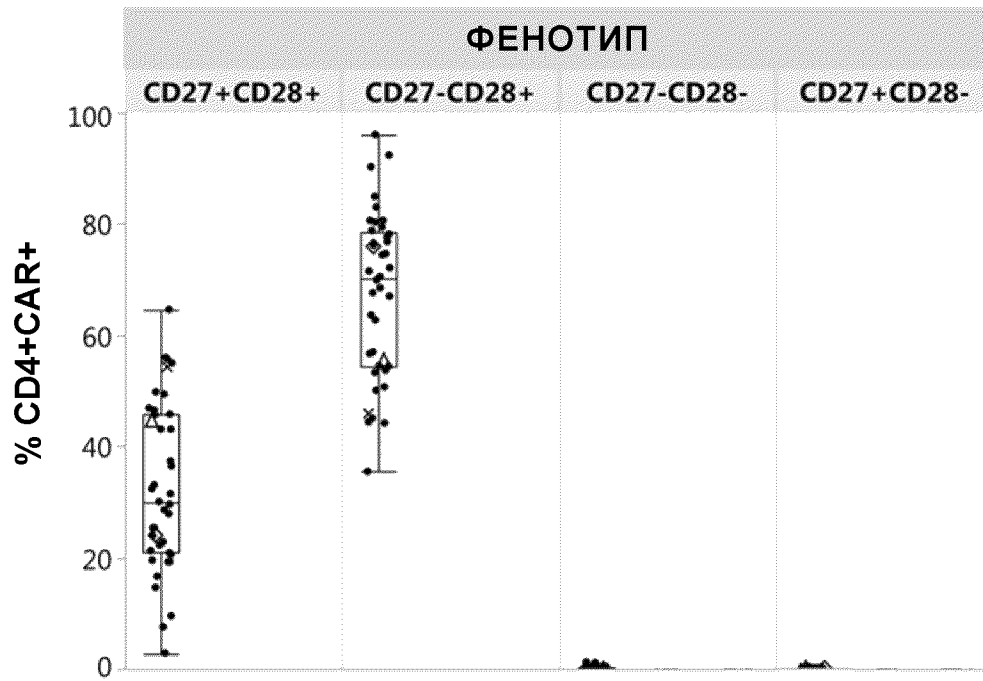
ФИГ.1А



ФИГ.1В



ФИГ.1С



ФИГ.1D

