(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202091408 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.21

(22) Дата подачи заявки
2018.12.07

(51) Int. Cl. ***C07K 14/725*** (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОК

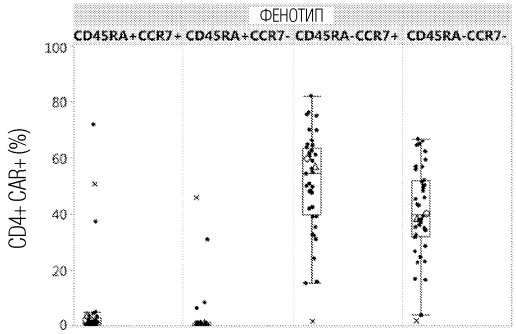
(31) **62/596,774; 62/614,965; 62/716,971; 62/721,604; 62/740,903; 62/754,564; 62/774,165; 62/774,855**
(32) **2017.12.08; 2018.01.08; 2018.08.09; 2018.08.22; 2018.10.03; 2018.11.01; 2018.11.30; 2018.12.03**
(33) **US**
(86) **PCT/US2018/064628**
(87) **WO 2019/113557 2019.06.13**

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

(72) Изобретатель:
Муячич Мирна, Рахарджо Айю, Бошен Паскаль, Кхуу-Дуонг Кьен, Аифува Айви, Чэн Кэлвин (US)

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

(57) Настоящее изобретение предоставляет способы генетического конструирования Т-клеток, таких как CD4+ и/или CD8+ Т-клеток, для использования их в клеточной терапии. В некоторых аспектах предоставленные способы включают одну или несколько стадий объединения обогащенных CD4+ и CD8+ клеток, например, в соотношении 1:1, а затем клетки инкубируют в стимулирующих условиях, вводят рекомбинантный полипептид в клетки посредством трансдукции или трансфекции, и проводят культивирование клеток в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению. В некоторых аспектах предоставленные способы являются эффективным и надежным средством для получения генно-инженерных Т-клеток с высокой степенью успеха.



202091408 A1

202091408 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563444EA/032

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОК

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] Эта заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США 62/596774, поданной 8 декабря 2017г., озаглавленной "PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS"; предварительной заявке США 62/614965, поданной 8 января 2018г., озаглавленной "PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS"; предварительной заявке США 62/716971, поданной 9 августа 2018г., озаглавленной "PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS"; предварительной заявке США 62/72604, поданной 22 августа 2018г., озаглавленной "PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS"; предварительной заявке США 62/740903, поданной 3 октября 2018г., озаглавленной "PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS"; предварительной заявке США 62/754564, поданной 1 ноября 2018г., озаглавленной "PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS"; предварительной заявке США 62/774165, поданной 30 ноября 2018г., озаглавленной "PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS"; и по предварительной заявке США 62/774855, поданной 3 декабря 2018г., озаглавленной "PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS", содержание которых во всей полноте для всех целей включено в настоящее описание посредством ссылки.

Включение списка последовательностей путем ссылки

[0002] Настоящая заявка подается вместе со списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей представлен в виде файла, озаглавленном "7350420 l4340Seq.txt", созданном 7 декабря 2018г., размером 68 килобайт. Информация о списке последовательностей в электронном формате включена в настоящее описание посредством ссылки во всей ее полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

[0003] Настоящее изобретение относится к способам генетической инженерии Т-клеток, таких как CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки, для их использования в клеточной терапии. В некоторых аспектах предложенные способы включают одну или несколько стадий объединения обогащенных CD4+ и CD8+ клеток в соотношении, таком как 1:1, и затем инкубирования клеток в условиях стимуляции, введения рекомбинантного полипептида в клетки посредством трансдукции или трансфекции, и/или культивирования клеток в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение. В некоторых аспектах предложенные способы являются эффективными, надежными способами получения генетически сконструированных Т-клеток с высокой степенью успеха.

Предпосылки создания изобретения

[0004] Для лечения ряда заболеваний и состояний пригодны различные способы клеточной терапии. Среди способов клеточной терапии известны способы, включающие использование иммунных клеток, таких как Т-клетки, генетически сконструированных с рекомбинантными рецепторами, такими как химерные рецепторы антигенов. Необходимы улучшенные способы получения и/или конструирования таких клеток для терапии, в том числе для обеспечения более эффективного процесса и/или получения улучшенного продукта в виде композиции клеток.

[0005] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения композиции сконструированных клеток, включающий: (a) объединение композиции CD4+ Т-клеток и композиции CD8+ Т-клеток в соотношении CD4+ и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, получая тем самым входную (исходную) композицию; (b) инкубирование входной композиции при стимулирующих условиях, получая тем самым стимулированную композицию, где указанные условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул; и где входная композиция содержит по меньшей мере 100×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл.

[0006] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения композиции сконструированных клеток, включающий инкубирование входной композиции в условиях стимуляции с образованием стимулированной композиции, где: входная композиция имеет соотношение между CD4+ и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, и где входная композиция содержит по меньшей мере 100×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл; и условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул.

[0007] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения композиции сконструированных клеток, включающий введение рекомбинантного рецептора в клетки композиции Т-клеток, где указанная композиция Т-клеток имеет концентрацию по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^6 жизнеспособных клеток на мл, где по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток композиции Т-клеток представляют собой CD4+ Т-клетки или CD8+ Т-клетки.

[0008] В некоторых вариантах осуществления инкубирование проводят в бессывороточных средах. В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция содержит по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток, которые представляют собой CD4+ Т-клетки или

CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция содержит от 100 × 10^6 до 500 × 10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения входная композиция содержит по меньшей мере приблизительно 300 × 10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления все CD4+ и CD8+ Т-клетки являются жизнеспособными клетками. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения входная композиция имеет концентрацию от 1 × 10^6 клеток/мл до 5 × 10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения входная композиция имеет концентрацию или имеет концентрацию приблизительно 3 × 10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция имеет соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток равное от 1,5:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция имеет соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток от 1,2:1 до 0,8:1.

[0009] В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция имеет соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток равное или приблизительно равное 1:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CD45RA и CCR7.

[0010] В некоторых вариантах осуществления соотношение CD4+ клеток, поверхностно-положительных по CD45RA и CCR7 к CD8+ клеткам, поверхностно-положительных по CD45RA и CCR7, равно или приблизительно равно 1,1:1.

[0011] В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CD27 и CCR7.

[0012] В некоторых вариантах осуществления соотношение CD4+ клеток, которые являются поверхностно-положительными по CD27 и CCR7, к CD8+ клеткам, поверхностно-положительным по CD27 и CCR7, равно или приблизительно равно 1,69:1.

[0013] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CCR7 и поверхностно-негативными по CD62L, необязательно в соотношении от 2,0:1 до 1,5:1.

[0014] Некоторые варианты осуществления изобретения дополнительно включают: введение рекомбинантного рецептора в клетки из стимулированной композиции, получая таким образом сконструированную композицию клеток, где введение включает приведение клеток стимулированной композиции в контакт с агентом, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. Некоторые варианты осуществления изобретения дополнительно включают введение рекомбинантного рецептора в клетки из стимулированной композиции, получая таким образом сконструированную композицию клеток, где введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют в бессывороточных средах.

[0015] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения композиции сконструированных клеток, включающий: (a) объединение композиции CD4+ Т-клеток и композиции CD8+ Т-клеток в соотношении CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, получая тем самым входную композицию; (b) инкубирование входной композиции при стимулирующих условиях, получая тем самым стимулируемую композицию, способную активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул; и где входная композиция содержит по меньшей мере 100×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл.

[0016] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов, CD4+ и CD8+ клетки во входной композиции обогащены или выделены из первичной пробы, полученной от субъекта, где необязательно CD4+ и CD8+ клетки во входной композиции отдельно обогащены или выделены из первичной пробы, полученной от субъекта. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов композиция CD4+ Т-клеток содержит по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов композиция CD8+ Т-клеток включает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% CD8+ Т-клеток.

[0017] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения композиции сконструированных клеток, включающий инкубирование входной композиции в условиях стимуляции с образованием стимулированной композиции, где: входная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, и где входная композиция содержит по меньшей мере 100×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл, и условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул.

[0018] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов инкубирование проводят в бессывороточных средах. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов входная композиция содержит по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток, которые представляют собой CD4+ Т-клетки или CD8+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов входная композиция содержит от 100×10^6 до 500×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов входная композиция содержит или приблизительно содержит 300×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток.

[0019] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов общие CD4+ и CD8+ Т-клетки являются жизнеспособными клетками. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов входная композиция имеет концентрацию от 1×10^6 клеток/мл до 5×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов входная композиция имеет концентрацию равную или приблизительно равную 3×10^6 клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов входная композиция имеет соотношение между CD4+ и CD8+ клетками от 1,5:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов входная композиция имеет соотношение между CD4+ и CD8+ клеткам от 1,2:1 до 0,8:1.

[0020] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов входная композиция имеет соотношение между CD4+ и CD8+ клетками равное или приблизительно равное 1:1. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов входная композиция содержит CD4+ и CD8+, которые являются поверхностно-положительными по CD45RA и CCR7. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов соотношение между CD4+ клетками, поверхностно-положительными по CD45RA и CCR7 и CD8+ клетками, поверхностно-положительными по CD45RA и CCR7, равно или приблизительно равно 1,1:1. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CD27 и CCR7. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов соотношение между CD4+ клетками, которые являются поверхностно-положительными по CD27 и CCR7, к CD8+ клеткам, поверхностно-положительными по CD27 и CCR7, равно или приблизительно равно 1,69:1. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CCR7 и поверхностно-негативными по CD62L, необязательно в соотношении от 2,0:1 до 1,5:1.

[0021] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов эти способы дополнительно включают: введение рекомбинантного рецептора в клетки из стимулированной композиции, получая таким образом сконструированную композицию клеток, где введение включает приведение клеток стимулированной композиции в контакт с агентом, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

[0022] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов эти способы предусматривают: осуществление контактирования путем трансфекции вектором, где вектор представляет собой транспозон, необязательно транспозон Sleeping Beauty (SB) или транспозон Piggybac; или контактирование осуществляют путем трансдукции вирусным вектором.

[0023] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов эти способы дополнительно включают: введение рекомбинантного рецептора в

клетки стимулированной композиции, получая таким образом сконструированную композицию клеток, где введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов введение осуществляют в бессывороточных средах.

[0024] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов, способ предусматривает такое введение в стимулированную композицию, содержащую менее 300×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов, способ предусматривает введение в стимулированную композицию, содержащую от 50×10^6 клеток до 200×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов, способ предусматривает введение в стимулированную композицию, содержащую или приблизительно содержащую 100×10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов, способ предусматривает введение в стимулированную композицию, имеющую концентрацию менее чем 3×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов, способ предусматривает введение в стимулированную композицию, имеющую концентрацию от $0{,}5 \times 10^6$ клеток/мл до 2×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов, способ предусматривает в введение в стимулированную композицию, имеющую концентрацию равную или приблизительно равную 1×10^6 клеток/мл.

[0025] Конкретные варианты осуществления любого из представленных способов включают регулирование состава стимулируемой композиции после инкубирования в условиях стимуляции до введения рекомбинантного рецептора в клетки стимулируемой композиции. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов клетки стимулированной композиции являются жизнеспособными клетками. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения композиции сконструированных клеток, включающий введение рекомбинантного рецептора в клетки композиции Т-клеток, где указанная композиция Т-клеток имеет концентрацию по меньшей мере равную или по меньшей мере приблизительно равную 1×10^6 жизнеспособных клеток на мл, где по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток композиции Т-клеток представляют собой CD4+ Т-клетки или CD8+ Т-клетки.

[0026] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов концентрация композиции Т-клеток составляет менее чем 5×10^6 жизнеспособных клеток на мл. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов композиция Т-клеток содержит по меньшей мере или содержит по меньшей мере приблизительно 100×10^6 жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов композиция Т-клеток содержит менее чем 300×10^6 жизнеспособных клеток. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов введение включает контактирование

Т-клеток путем трансдукции вирусного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

[0027] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов введение осуществляют в бессывороточных средах. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов одна или несколько клеток композиции Т-клеток активированы и/или поверхностно экспрессируют рецептор LDL.

[0028] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% или по меньшей мере 60% клеток в композиции клеток: (i) экспрессируют поверхностный маркер, выбранный из группы, состоящей из HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L и 4-1BB; (ii) внутриклеточно экспрессируют цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма, TNF-альфа; (iii) находятся в фазе G1 или более поздней фазе клеточного цикла; и/или (iv) способны пролиферировать.

[0029] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов, клетки композиции перед введением получают способом, включающим инкубирование входной композиции, содержащей CD4+ и CD8+ Т-клетки, в условиях стимуляции, где указанные условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов инкубирование проводят в бессывороточных средах.

[0030] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения композиции сконструированных клеток, включающий: (a) инкубирование входной композиции в условиях стимуляции с образованием стимулированной композиции, где: входная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, и содержит по меньшей мере 100×10^6 CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл, и условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул; и (b) введение рекомбинантного рецептора в менее чем 300×10^6 клеток стимулированной композиции, получая таким образом сконструированную композицию клеток, где введение включает контактирование клеток стимулированной композиции с вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

[0031] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов инкубирование и/или введение осуществляют в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов CD4+ и CD8+ Т-клетки

являются жизнеспособными клетками. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов клетки стимулированной композиции являются жизнеспособными клетками.

[0032] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов введение инициируют в течение 2 дней после начала инкубирования в условиях стимуляции, и/или в течение 2 дней после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов введение инициируют в течение 36 часов после начала инкубирования в условиях стимуляции, и/или в течение 36 часов после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов введение инициируют в течение 30 часов после начала инкубирования в условиях стимуляции, и/или в течение 30 часов после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

[0033] Некоторые варианты осуществления любого из представленных способов дополнительно включают культивирование сконструированной композиции в условиях, способствующих пролиферации и/или размножению сконструированных клеток, в результате чего получают выходную композицию, содержащую сконструированные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов культивирование проводят в бессывороточных средах.

[0034] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения композиции сконструированных клеток, включающий: (a) инкубирование входной композиции в условиях стимуляции с образованием стимулированной композиции; где входная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, и где входная композиция содержит по меньшей мере 100×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл; и где условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул; (b) введение рекомбинантного рецептора в менее чем 300×10^6 клеток стимулированной композиции, где введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор; и (c) культивирование сконструированной композиции в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение сконструированных клеток, в результате чего получают выходную композицию, содержащую сконструированные Т-клетки.

[0035] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов инкубирование, введение и/или культивирование проводят в бессывороточной среде.

[0036] В некоторых вариантах осуществления любого из предложенных способов входная композиция имеет соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,2:1 до 0,8:1, необязательно 1:1 или приблизительно 1:1. В частности, осуществления

любого из представленных способов, предусматривают, что входная композиция содержит CD4+ и CD8+, которые являются поверхностно-положительными по CD45RA и CCR7. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов соотношение между CD4+ клетками, поверхностно-положительными по CD45RA и CCR7, и CD8+ клетками поверхностно-положительными по CD45RA и CCR7, равно или приблизительно равно 1,1:1. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CD27 и CCR7. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов соотношение CD4+ клеток, которые являются поверхностно-положительными по CD27 и CCR7, к CD8+ клеткам, поверхностно-положительным по CD27 и CCR7, равно или приблизительно равно 1,69:1. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CCR7 и поверхностно-негативными по CD62L.

[0037] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов предусматривается введение стимулированной композиции, содержащей менее 300×10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов стимулируемая композиция содержит от 50×10^6 клеток до 200×10^6 клеток, необязательно по меньшей мере приблизительно 100×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов предусматривается введение стимулируемой композиции с концентрацией менее чем 3×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов предусматривается введение стимулированной композиции, имеющей концентрацию от $0,5 \times 10^6$ клеток/мл до 2×10^6 клеток/мл, необязательно равную или приблизительно равную 1×10^6 клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов, способ включает регулирование состава стимулированной композиции после инкубирования в условиях стимуляции до введения рекомбинантного рецептора в клетки стимулированной композиции.

[0038] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов инкубирование проводят в присутствии одного или нескольких цитокинов, например, в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов один или несколько цитокинов выбирают из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов один или несколько цитокинов содержат: от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7 и/или от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов один или несколько цитокинов содержат: от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

[0039] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% или по меньшей мере 60% клеток стимулированной композиции: (i) экспрессируют поверхностный маркер, выбранный из группы, состоящей из HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L и 4-1BB; (ii) внутриклеточно экспрессируют цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма, TNF-альфа; (iii) находятся в фазе G1 или более поздней фазе клеточного цикла; и/или (iv) способны пролиферировать.

[0040] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов стимулирующий реагент содержит первичный агент, который специфически связывается с членом семейства комплекса TCR, который необязательно специфически связывается с CD3. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов стимулирующий реагент дополнительно содержит вторичный агент, который специфически связывается с костимуляторной молекулой Т-клеток, где костимуляторная молекула необязательно выбрана из CD28, CD137 (4-L-BB), OX40 или ICOS. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов первичные и/или вторичные агенты включают антитело, где стимулирующий реагент необязательно включает инкубирование с анти-CD3-антителом и анти-CD28-антителом или с антигенсвязывающим фрагментом.

[0041] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов первичный агент и/или вторичный агент присутствуют на поверхности твердого носителя. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов твердый носитель представляет собой или содержит шарик. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов частица в форме шарика имеет диаметр более или приблизительно более 3,5 мкм, но не более чем приблизительно 9 мкм, или не более чем приблизительно 8 мкм, или не более чем приблизительно 7 мкм, или не более чем приблизительно 6 мкм, или не более чем приблизительно 5 мкм. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов частицы в форме шарика имеют диаметр равный или приблизительно равный 4,5 мкм. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов частица является инертной. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов частицы в форме шарика представляют собой частицы из полистирола или имеют поверхность из полистирола. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов частицы в форме шарика являются магнитными или суперпарамагнитными шариками.

[0042] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов соотношение между частицами и клетками составляет менее чем 3:1. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов соотношение между частицами и клетками составляет от или приблизительно от 2:1 до 0,5:1. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов соотношение между частицами и клетками равно или приблизительно равно 1:1.

[0043] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов входную композицию инкубируют в стимулирующих условиях в течение менее чем 48 часов. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов входную композицию инкубируют в стимулирующих условиях в течение от 12 часов до 36 часов включительно. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов входную композицию инкубируют в стимулирующих условиях в течение от 18 часов до 30 часов включительно. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов входную композицию инкубируют в стимулирующих условиях в течение или приблизительно в течение 24 часов.

[0044] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов контактирование, необязательно трансдукцию, проводят в течение менее чем 48 часов. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов контактирование, необязательно трансдукцию, проводят в течение от 12 часов до 36 часов включительно. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов контактирование, необязательно трансдукцию, проводят в течение от 18 часов до 30 часов включительно. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов контактирование, необязательно трансдукцию, проводят в течение или приблизительно в течение 24 часов.

[0045] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов контактирование, необязательно трансдукцию, осуществляют в отсутствие адъюванта трансдукции. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов введение осуществляют в присутствии одного или нескольких цитокинов, например, в бессывороточной среде. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов один или несколько цитокинов выбирают из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

[0046] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов один или несколько цитокинов включают: от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и/или от 10 МЕ/мл до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов один или несколько цитокинов содержат: от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и от 10 МЕ/мл до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

[0047] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов по меньшей мере часть культивирования проводят в условиях смешивании и/или перфузии. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов по меньшей мере часть культивирования проводят в условиях перфузии со скоростью,

равной или приблизительно равной или составляющей по меньшей мере 500 мл/день, 600 мл/день, 700 мл/день, 750 мл/день, 800 мл/день, 900 мл/день, 1000 мл/день, 1200 мл/день, 1400 мл/день, 1500 мл/день, 1600 мл/день, 1800 мл/день и/или 2000 мл/день. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов по меньшей мере первая часть культивирования выполняют со скоростью перфузии равной, приблизительно равной или составляющей по меньшей мере 500 мл/день, 750 мл/день или 1000 мл/день, и где по меньшей мере вторая часть культивирования выполняют со скоростью перфузии равной, приблизительно равной, или составляющей по меньшей мере 1200 мл/день, 1400 мл/день или 1500 мл/день.

[0048] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов перфузию инициируют и/или увеличивают, когда клетки достигают определенной плотности. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов указанная определенная плотность клеток равна, приблизительно равна или составляет по меньшей мере $0,4 \times 10^6$ клеток, $0,5 \times 10^6$ клеток, $0,6 \times 10^6$ клеток, $0,8 \times 10^6$ клеток, $1,0 \times 10^6$ клеток, $1,2 \times 10^6$ клеток, $1,4 \times 10^6$ клеток, $1,6 \times 10^6$ клеток, $1,8 \times 10^6$ клеток, $2,0 \times 10^6$ клеток, $2,2 \times 10^6$ клеток или $2,4 \times 10^6$ клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов перфузию инициируют и/или увеличивают до скорости равной или приблизительно равной 750 мл/день, когда клетки достигают плотности равной или приблизительно равной $0,6 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов перфузию инициируют и/или увеличивают до скорости равной или приблизительно равной 1500 мл/день, когда клетки достигают плотности равной или приблизительно равной $2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

[0049] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов культивирование проводят в присутствии одного или нескольких цитокинов, например, в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов один или несколько цитокинов выбирают из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов один или несколько цитокинов содержат: от 50 МЕ/мл до 400 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и/или от 50 до 400 МЕ/мл рекомбинантного IL-15. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов культивирование проводят в присутствии от 50 МЕ/мл до 400 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и от 50 до 400 МЕ/мл рекомбинантного IL-15, например, в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов один или несколько цитокинов включают: от 50 МЕ/мл до 400 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и/или от 10 МЕ/мл до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

[0050] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов культивирование инициируют в течение 3 дней после начала инкубирования в условиях

стимуляции и/или в течение 3 дней после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов культивирование инициируют в течение 60 часов после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 60 часов после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов культивирование начинают в течение 48 часов после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 48 часов после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

[0051] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов культивирование проводят по меньшей мере до тех пор, пока композиция не будет содержать пороговое количество Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов пороговое количество Т-клеток приблизительно равно или по меньшей мере равно 2400×10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов пороговое количество Т-клеток приблизительно равно или по меньшей мере равно 5500×10^6 клеток.

[0052] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов культивирование продолжают в течение по меньшей мере одного дня после достижения порогового количества Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов пороговое количество Т-клеток приблизительно равно или составляет по меньшей мере 900×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов пороговое количество Т-клеток приблизительно равно или составляет по меньшей мере 1200×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов культивирование заканчивается, когда число Т-клеток приблизительно равно или составляет по меньшей мере 2400×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов пороговое количество Т-клеток приблизительно равно или составляет по меньшей мере 3500×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов культивирование заканчивается, когда число Т-клеток приблизительно равно или составляет по меньшей мере 5500×10^6 клеток.

[0053] Некоторые варианты осуществления любого из представленных способов включают сбор клеток выходной (полученной) композиции после культивирования. Некоторые варианты осуществления любого из представленных способов включают сбор клеток выходной композиции после культивирования, где клетки выходной композиции собирают по меньшей мере через 9 дней после начала инкубирования в условиях стимуляции. Некоторые варианты осуществления любого из представленных способов включают сбор клеток выходной композиции после культивирования, где клетки выходной композиции собирают по меньшей мере через 10 дней после начала инкубирования в условиях стимуляции.

[0054] Конкретные варианты осуществления любого из представленных способов предусматривают 95% доверительный интервал времени между началом инкубирования и

сбором клеток выходной композиции, где такой интервал времени находится в пределах от 8 дней до 25 дней. Некоторые варианты осуществления любого из представленных способов включают 95% доверительный интервал времени между началом инкубирования и сбором клеток выходной композиции, где такой интервал времени находится в пределах от 9 до 21 день. Некоторые варианты осуществления любого из них обеспечивают 95% доверительный интервал времени между началом инкубирования и сбором клеток выходной композиции, где такой интервал времени находится в пределах от 9 до 16 дней.

[0055] Конкретные варианты осуществления любого из представленных способов дополнительно включают подготовку клеток выходной композиции для криоконсервирования и/или введения субъекту, необязательно в присутствии фармацевтически приемлемого эксципиента. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов клетки выходной композиции готовят в присутствии криопротектора. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов криопротектор включает DMSO. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов клетки выходной композиции собирают и помещают в контейнер, необязательно, во флакон или пакет/мешок.

[0056] Некоторые варианты осуществления любого из представленных способов включают выделение CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток из биологического образца перед инкубированием. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов выделение включает отбор клеток на основе поверхностной экспрессии CD4 и/или CD8, необязательно, путем положительного или негативного отбора. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов выделение включает проведение иммуноаффинного отбора. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов биологический образец содержит первичные Т-клетки, полученные у субъекта. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов субъектом является человек.

[0057] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов биологический образец представляет собой или содержит образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), образец нефракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкаферза. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов рекомбинантный рецептор способен связываться с антигеном-мишенью, который ассоциирован, специфичен и/или экспрессирован на клетке или ткани при конкретном заболевании, расстройстве или состоянии. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов заболевание, расстройство или состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, опухоль или рак.

[0058] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген. В некоторых

вариантах осуществления любого из представленных способов антиген-мишень выбирают из 5T4, 8H9, avb6 интегрина, B7-H6, антигена созревания B-клеток (BCMA), CA9, антигена рака яичек, карбоангидразы 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, поверхностного атигена гепатита B, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, карциноэмбрионального антигена (CEA), CE7, циклина, циклина A2, c-Met, двойного антигена, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), EPHa2, ephrin2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, рецептора эстрогена, фетального AchR, фолат-рецептора альфа, фолат-связывающего белка (FBP), FCR5, FCR5, фетального ацетилхолинового рецептора, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), HMW-MAA, IL-22R-альфа, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Rα2), рецептора домена вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, молекулы адгезии L1-клетки (L1-CAM), ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, лигандов NKG2D, NY-ESO-l, O-ацетилированного GD2 (OGD2), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), PSCA, рецептора прогестерона, сурвивина, ROR1, TAG72, рецепторов VEGF, VEGF-R2, опухоли Вильмса 1 (WT-1), антиген-специфического антигена и антигена, связанного с универсальной меткой.

[0059] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный антигенный рецептор не являющийся TCR, или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0060] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов рекомбинантным рецептором является химерный рецептор антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов рекомбинантным рецептором является анти-BCMA CAR. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов химерный рецептор антигена содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или фрагмент антитела, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов фрагмент содержит вариабельные области антитела, соединенные гибким линкером. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов фрагмент содержит scFv. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов химерный рецептор антигена дополнительно содержит спейсер и/или шарнирную область.

[0061] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов химерный рецептор антигена содержит внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов

внутриклеточная сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий мотив активации иммунорецепторов на основе тирозина (ITAM). В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или содержит внутриклеточный сигнальный домен CD3-цепи, необязательно цепи CD3-zeta (CD3ζ), или его сигнальную часть.

[0062] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов химерный рецептор антигена дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов внутриклеточная сигнальная область дополнительно содержит костимуляторную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов костимуляторная сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен костимуляторной молекулы Т-клеток или его сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов костимуляторная сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или его сигнальную часть.

[0063] В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов костимуляторная сигнальная область находится между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов выходную композицию, содержащую пороговое количество или большее количество клеток, получают в пределах более чем или более чем приблизительно 85%, более или более чем приблизительно 90% или более или более чем приблизительно 95% итераций способа.

[0064] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов бессывороточная среда содержит: от 0,5 мМ до 5 мМ дипептидной формы L-глутамина в основной среде; от 0,5 мМ до 5 мМ L-глутамина; и по меньшей мере один белок, где среда не содержит сыворотки. В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов дипептидная форма L-глутамина представляет собой L-аланил-L-глутамин.

[0065] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов концентрация дипептидной формы L-глутамина в бессывороточной среде, равна или составляет приблизительно 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов концентрация L-глутамина в бессывороточной среде равна или приблизительно равна 2 мМ. в конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов по меньшей мере один белок содержит один или несколько

белков из числа альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно одного или нескольких белков из числа человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

[0066] В некоторых из вариантов осуществления способов, представленных в настоящем документе, во время по меньшей мере части времени культивирования клетки подвергают контролю в отношении их жизнеспособности, концентрации, плотности, количества или их комбинации. В некоторых из таких вариантов осуществления контроль осуществляют оптическим методом, необязательно микроскопией. В некоторых из таких вариантов осуществления контроль осуществляют с помощью микроскопии в светлом поле, флуоресцентной микроскопии, дифференциальной интерференционной контрастной микроскопии, фазоконтрастной микроскопии, цифровой голографии (DHM), дифференциальной цифровой голографии (DDHM) или их комбинации. В некоторых из таких вариантов осуществления контроль выполняют посредством дифференциальной цифровой голографии (DDHM). В некоторых из таких вариантов осуществления контроль проводят периодически или непрерывно в течение по меньшей мере части времени культивирования, необязательно, по меньшей мере каждые 1 час, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа или 26 часов во время культивирования. В некоторых из таких вариантов осуществления контроль выполняют до тех пор, пока клетки не достигнут порогового количества Т-клеток, порогового количества жизнеспособных Т-клеток, пороговой концентрации Т-клеток или пороговой концентрации жизнеспособных Т-клеток. В некоторых из таких вариантов осуществления контроль и культивирование проводят в закрытой системе.

[0067] В некоторых из любых вариантов осуществления способов, представленных в настоящем документе, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более 95% клеток в выходной композиции представляют собой клетки с фенотипом памяти; по меньшей мере, 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более 95% клеток в выходной композиции представляют собой клетки с фенотипом центральной памяти; по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в выходной композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B- и/или CD127+ клетки; и/или по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в выходной композиции представляют собой CCR7+/CD45RA- клетки или представляют собой CCR7+/CD45RO+ клетки.

[0068] В некоторых из любых вариантов осуществления способов, представленных в настоящем документе, итерации способа дают несколько выходных композиций, необязательно из биологических образцов человека, среди множества различных субъектов, где: средний процент клеток с фенотипом памяти в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%; средний процент клеток с центральном фенотипом памяти в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60% или от приблизительно 60% до приблизительно 65%; средний процент клеток, которые представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B- и/или CD127+ клеток в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%; средний процент клеток, которые представляют собой CCR7+/CD45RA-или CCR7+/CD45RO+ клетки в нескольких выходных композициях, составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60% или от приблизительно 60% до приблизительно 65%; средний процент CD4+ Т-клеток с центральной памятью в созданных CD4+ Т-клетках, необязательно, CAR+CD4+ Т-клеток, в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%; средний процент CD8+ Т-клеток с центральной памятью в созданных CD8+ Т-клетках, необязательно CAR+CD8+ Т-клетках, в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%; и/или средний процент Т-клеток с центральной памятью, необязательно CD4+ Т-клеток с центральной памятью и CD8+ Т-клеток с центральной памятью, в сконструированных Т-клетках, необязательно CAR+ Т-клетках, в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно

45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%.

[0069] В некоторых из любых вариантов осуществления способов, представленных в настоящем документе, способы дают выходные композиции, имеющие предварительно заданный признак, необязательно представляющий собой пороговое количество клеток, экспрессирующих CAR в выходной композиции, составляющее по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 99%, приблизительно 100% или 100% от количества клеток в биологических образцах человека, среди множества различных отдельных субъектов. В некоторых из таких вариантов осуществления множество различных субъектов имеют заболевание или состояние. В некоторых из таких вариантов осуществления заболевание или состояние представляет собой рак. В некоторых из таких вариантов осуществления рак представляет собой гематологический рак, необязательно, множественную миелому. В некоторых из таких вариантов осуществления по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в композиции представляют собой клетки с фенотипом памяти; по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в композиции представляют собой клетки с фенотипом центральной памяти; по меньшей мере, 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, гранзим B- и/или CD127+ клетки; по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более 95% клеток в выходной композиции представляют собой CCR7+/CD45RA- клетки или представляют собой CCR7+/CD45RO+ клетки.

[0070] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается композиция, содержащая сконструированные клетки, полученные любым способом, представленным в настоящей заявке. Некоторые варианты любого осуществления настоящего изобретения включают композиции, содержащие фармацевтически приемлемый носитель. Конкретные варианты осуществления любой из представленных композиций включают криопротектор, необязательно DMSO.

[0071] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к изделию, содержащему любую композицию, представленную в настоящем документе, и инструкции для введения выходной композиции субъекту. В некоторых вариантах

осуществления настоящего изобретения субъект имеет заболевание или состояние, где, необязательно, рекомбинантный рецептор специфически распознает или специфически связывается с антигеном, ассоциированным или экспрессированным или присутствующим в клетках, связанных с заболеванием или состоянием.

Краткое описание фигур и чертежей

[0072] На Фиг. 1A показан график двумерного анализа соответствия соотношения жизнеспособных CD4+ клеток к жизнеспособным CD8+ клеткам (отношение жизнеспособных CD4+/CD8+) в образце для афереза по сравнению с соотношением CAR+ CD4+ Т-клеток к CAR+ CD8+ Т-клеткам (CAR+ CD4+/CD8+ соотношение) в Т-композиции клеток после активации Т-клеток, их трансдукции с помощью конструкции химерного антигена (CAR) и размножения. Кривые линии представляют границы двумерного нормального эллипса при p=0,990. Точки данных представляют средние отношения для четырех образцов от каждого субъекта, включая здоровых субъектов (кружки) и субъекта с миеломой (плюс знак). На Фиг.1B представлен график двумерного анализа соответствия отношения CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 в исходной смеси отобранных CD4 и CD8 клеток по отношению CAR+ CD4+/CD8+ в Т-композиции клеток после активации Т-клеток, их трансдукции с помощью конструкции для химерного рецептора антигена (CAR) и размножения. Кривые линии представляют границы двумерного нормального эллипса распределения при p=0,990. Точки на графике представляют средние отношения для четырех образцов от каждого субъекта, включая здоровых субъектов (кружки) и субъекта с миеломой (знак плюс).

[0073] На Фиг. 2A-2C представлены графики двумерного анализа соответствия отношения клеток с различными фенотипами в исходной смеси отобранных CD4 и CD8 клеток по отношению CAR+ CD4+/CD8+ в композиции сконструированных CAR+ Т-клеток. На Фиг. 2A представлен график двумерного анализа соответствия отношения CD45RA+/CCR7+/CD4+ клеток к CD45RA+/CCR7+/CD8+ клеткам в исходной смеси отобранных CD4 и CD8 клеток по отношению CAR+ CD4+/CD8+ в композиции сконструированных CAR+ Т-клеток. На Фиг. 2B представлен график двумерного анализа соответствия отношения CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток к CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеткам в исходной смеси отобранных CD4 и CD8 клеток по отношению CAR+ CD4+/CD8+ в композиции сконструированных CAR+ Т-клеток. На Фиг. 2C представлен график двумерного анализа соответствия отношения CD27+/CCR7+/CD4+ Т-клеток к CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеткам в исходной смеси отобранных CD4 и CD8 клеток по отношению CAR+ CD4+/CD8+ в композиции сконструированных CAR+ Т-клеток. Кривые линии представляют границы двумерного нормального эллипса распределения при p=0,950. Точки на графике представляют средние отношения для множества композиций от каждого субъекта, включая здоровых доноров (кружки) и пациента с множественной миеломой (знаки плюс).

[0074] На Фиг. 3A-3C представлены графики двумерного анализа соответствия отношения клеток с различными фенотипами в исходной смеси отобранных CD4 и CD8

клеток от семи доноров с множественной миеломой по отношению CAR+ CD4+/CD8+ в композиции сконструированных CAR+ Т-клеток. На Фиг. 3A представлен график двумерного анализа соответствия отношения CD27+/CCR7+/CD4+ клеток к CD27+/CCR7+/CD8+ клеткам в исходной смеси отобранных CD4 и CD8 клеток по отношению CAR+ CD4+/CD8+ в композиции сконструированных CAR+ Т-клеток. На Фиг. 3B представлен график двумерного анализа соответствия отношения CD27+/CCR7+/CD4+ Т-клеток к CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеткам в исходной смеси отобранных CD4 и CD8 клеток по отношению CAR+ CD4+/CD8+ в композиции сконструированных CAR+ Т-клеток. На Фиг. 3C представлен график двумерного анализа соответствия отношения CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток к CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеткам в исходной смеси отобранных CD4 и CD8 клеток по отношению CAR+ CD4+/CD8+ в композиции сконструированных CAR+ Т-клеток. Кривые линии представляют границы двумерного нормального эллипса распределения при p=0,950.

[0075] На Фиг.4A и 4B показаны количества жизнеспособных клеток (VCC; $\times 10^6$ клеток/мл) и жизнеспособность клеток в %, оцененные с использованием непрерывного мониторинга с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DHM) в экспериментальном опыте 1 (Фиг. 4A) и в опыте 2 (Фиг. 4B). Верхние панели отображают результаты измерений для каждой пробы, нижние панели показывают результаты линейного регрессионного анализа, включая значения R и наклона (s) для сравнения непрерывного контроля и ручного отбора проб.

[0076] На Фиг. 5 показано количество жизнеспособных клеток (VCC; $\times 10^6$ клеток/мл) и жизнеспособность клеток в %, оцениваемые при непрерывном мониторинге с помощью дифференциальной DHM в автоматизированном процессе размножения клеток по сравнению с процессом размножения с ручным отбором проб.

[0077] На Фиг.6A-6D показаны типичные фенотипические профили 40 сконструированных композиций CAR+ Т-клеток, полученных от пациента с множественной миеломой. Профили экспрессии CD45RA×CCR7 среди клеток CAR+ Т показаны для популяций CD4+ (Фиг.6A) и популяций CD8+ (Фиг.6B). Профили экспрессии CD27×CD28 среди CAR+ Т-клеток показаны для популяций CD4+ (Фиг.6C) и популяций CD8+ (Фиг.6D).Каждая композиция CAR+ Т-клеток показана точкой (□), крестиком (×), ромбиком (□) или треугольником (Δ).

Подробное описание изобретения

[0078] В данном описании представлены способы приготовления или получения композиций сконструированных клеток, таких как сконструированные CD4+ и CD8+ Т-клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления способы используют процесс, который включает инкубирование клеток, таких как входная композиция клеток, в условиях стимуляции; генетическое конструирование клеток, например, путем трансдукции или трансфекции полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, и/или культивирования сконструированных клеток в условиях, которые стимулируют пролиферацию и/или размножение клеток.

[0079] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения композиции сконструированных клеток, включающий объединение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток в соотношении от 2:1 до 1:2 для получения входной композиции и инкубирование входной композиции в условиях стимуляции. В некоторых вариантах осуществления способ включает инкубирование входной композиции, с соотношением CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2. В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция содержит по меньшей мере 100×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл.

[0080] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения композиции сконструированных клеток, включающий введение рекомбинантного рецептора в совокупность клеток или в клетки в количестве, составляющем, например, по меньшей мере или приблизительно равное 1×10^6, 10×10^6, 100×10^6 или 1000×10^6 клеток в композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки являются стимулированными клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки являются жизнеспособными клетками. В конкретных вариантах осуществления введение включает трансдукцию Т-клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления композиция клеток включает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток, которые представляют собой CD4+ Т-клетки или CD8+ Т-клетки.

[0081] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения композиции сконструированных клеток, включающий: (i) инкубирование входной композиции в условиях стимуляции, образуя, таким образом, стимулированную композицию; при этом входная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, и входная композиция содержит по меньшей мере 100×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл; (ii) введение рекомбинантного рецептора в менее чем 300×10^6 клеток стимулированной композиции, получая тем самым композицию сконструированных клеток, при этом введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор; и (iii) культивирование сконструированной композиции клеток, содержащей полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение сконструированных клеток, получая в результате этого выходную композицию, содержащую сконструированные Т-клетки.

[0082] Существуют различные способы получения генетически сконструированных популяций Т-клеток, включающие получение сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют химерный рецептор антигена. Однако в некоторых вариантах осуществления некоторые из этих процессов могут потребовать длительного или относительно длительного времени для создания сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления некоторые из этих процессов могут различаться по

их способности успешно образовывать сконструированные клетки, пригодные для терапии у различных субъектов. В некоторых вариантах осуществления некоторые из этих способов могут обеспечить продуцирование композиции генно-инженерных Т-клеток с высокой степенью изменения параметров, таких как жизнеспособность, выживаемость, эффективность трансдукции и/или активность клеток.

[0083] Представленные варианты осуществления направлены на решение одной или нескольких этих проблем. В конкретных вариантах осуществления предложенные способы получения сконструированных Т-клеток, пригодных для терапии, например, для аутологичной клеточной терапии, в короткий или относительно короткий промежуток времени, по сравнению с некоторыми существующими способами. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления предложенные способы приводят к более оптимальным и менее вариабельным процессам в отношении количества времени, необходимого для получения сконструированных клеток из образцов, собранных у различных субъектов. В частности, варианты осуществления настоящего изобретения способны успешно обеспечить получение сконструированных Т-клеток, пригодных для клеточной терапии, у большой части субъектов. В некоторых вариантах осуществления полученные клеточные композиции содержат высокие или относительно высокие доли жизнеспособных клеток, например, клеток, которые являются жизнеспособными и/или не экспрессируют маркер апоптоза, высокие или относительно высокие доли клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, и/или клетки с высокой или относительно высокой активностью, например, цитотоксической, противоопухолевой активностью и/или способностью продуцировать цитокины в ответ на стимуляцию антигеном. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы обеспечивают способ получения сконструированных клеточных продуктов, и в некоторых аспектах способы обеспечивают конкретные показатели, такие как высокие показатели эффективности или показатели успеха, большие, чем пороговые показатели для способов, в которых получают терапевтические клеточные композиции, и имеющие определенные требуемые или желательные показатели свойств для большого количества или большой доли образцов, например для всех или для большей доли образцов, полученных от различных отдельных субъектов или пациентов, таких как субъекты или пациенты, подлежащие лечению терапевтической композицией (например, в контексте аутологичной клеточной терапии). В некоторых аспектах субъекты или пациенты имеют заболевание или состояние, такое как рак, в частности, рак крови или гематологический рак, такой как множественная миелома. В некоторых аспектах образцы, из которых, для высокого процентного содержания, можно получать терапевтические композиции клеток, представляют собой образцы от пациентов, включая те, которые являются вариабельными в части показателей фенотипов клеток, или других параметров образцов или клеток в них.

[0084] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы обеспечивают получение композиции сконструированных Т-клеток, которые имеют улучшенные или высокие показатели жизнеспособности, например, по сравнению с

композициями клеток, полученных с помощью других процессов. В некоторых вариантах осуществления композиции включают высокую долю клеток, которые являются негативными по маркеру апоптоза. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы обеспечивают получение композиций Т-клеток, содержащих полифункциональные клетки, способные устойчиво продуцировать цитокины. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы обеспечивают получение композиций Т-клеток, которые обогащены клетками с фенотипом памяти, обогащены клетками с центральным фенотипом памяти и/или обогащенными клетками, которые являются CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B- и/или CD127+ клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% или более клеток в композиции (или по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% или более клеток в композиции из по меньшей мере половины или большей части образцов, полученных с использованием способов или, в среднем, для образцов, полученных с использованием способов) Т-клеток в композиции, или сконструированных Т-клеток в композиции являются Т-клетками с центральным фенотипом памяти; являются CD27+, CD28+; CCR7+, CD45RA-; и/или CCR7+, CD45RO+ клетками. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80, или 85, или 90, или 95% или более клеток в композиции (или по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80, или 85, или 90, или 95% или более клеток в композиции из по меньшей мере половины или большей части образцов, полученных с использованием способов или, в среднем, для образцов, полученных с использованием способов) Т-клеток в композиции, или сконструированных Т-клеток в композиции являются Т-клетками с фенотипом памяти; являются CD45RA-; и/или CD45RO+ клетками.

[0085] В конкретных вариантах осуществления предлагаемые способы используют в качестве процесса эффективного получения или приготовления сконструированных клеток, которые пригодны для использования в клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления время, условия и реагенты, используемые для каждой стадии способа, повышают эффективность каждой последующей стадии и/или эффективность всего процесса. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки могут быть инкубированы, трансдуцированы и/или культивированы при концентрациях клеток, которые являются достаточно высокими для достижения желаемого эффекта, например для стимуляции клеток или улучшенной эффективности трансдукции, но при концентрациях, которые являются достаточно низкими, чтобы избежать замедления роста или уменьшения выживания на последующих стадиях обработки. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления стадии процесса синхронизированы с началом или окончанием в определенные моменты времени стадий для улучшения эффективности последующих стадий процесса и/или всего процесса. Например, в некоторых вариантах осуществления стадии инкубирования и конструирования (например, трансдукции или трансфекции клеток) завершают ранее, чем в альтернативных способах, которые в

некоторых вариантах осуществления улучшают выживание и/или жизнеспособность, и/или скорость пролиферации и размножения клеток во время последующей стадии культивирования. Таким образом, в одном аспекте конкретные моменты времени, условия и реагенты каждой стадии влияют на клетки в других отдельных стадиях, а в некоторых вариантах осуществления влияют на эффективность всего процесса.

[0086] В некоторых вариантах осуществления способы используют в качестве процесса получения или приготовления генетически сконструированных клеток, которые подходят для клеточной терапии, где способ может быть более быстрым и более эффективным, чем альтернативные способы. В некоторых вариантах осуществления способы, представленные здесь, имеют высокий уровень успеха образования или получения композиций сконструированных клеток от более широкой популяции субъектов, чем уровень, достигаемый альтернативными способами. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, полученные или приготовленные предлагаемыми способами, могут иметь большую жизнеспособность, выживание, активность и могут иметь большую экспрессию рекомбинантного рецептора, чем клетки, полученные альтернативными способами. Таким образом, в некоторых аспектах скорость и эффективность предлагаемых способов создания сконструированных клеток для клеточной терапии обеспечивают более легкое планирование и координацию лечения методами клеточной терапии, таких как аутологичная терапия для более широкой популяции субъектов, чем некоторые альтернативные способы.

[0087] Все публикации, в том числе патентные документы, научные статьи и базы данных, упомянутые в этой заявке, включены посредством ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была отдельно включена посредством ссылки. Если приведенное здесь определение противоречит или иным образом не согласуется с определением, приведенным в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены сюда посредством ссылки, приведенное здесь определение имеет преимущественную силу над определением, которое включено сюда посредством ссылки.

[0088] Заголовки разделов, используемые здесь, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объект изобретения.

I. Способы получение сконструированных клеток

[0089] В данном описании представлены способы получения выходной композиции сконструированных клеток, таких как сконструированные CD4+ и CD8+ Т-клетки, которые экспрессируют рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, такой как Т-клеточный рецептор (TCR), или химерный рецептор антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем документе, используются для конструирования, продуцирования или получения клеток для клеточной терапии и в них могут быть использованы дополнительные стадии обработки, такие как стадии выделения, разделения, отбора, активации или стимуляции,

трансдукции, промывки, суспендирования, разбавления, концентрирования и/или приготовления композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления способы конструирования или получения сконструированных клеток, например сконструированных CD4+ и CD8+ Т-клеток, включают одну или несколько стадий из выделения клеток от субъекта, приготовление исходной композиции клеток, обработку, инкубирование клеток при стимулирующих условиях и/или генно-инженерные манипуляции или конструирование (например, трансдукцию) с клетками. В некоторых вариантах осуществления способ включает стадии обработки, выполняемые в следующем порядке: сначала выделяют входные клетки, например первичные CD4+ и CD8+ клетки, например, отбранные или выделенные из биологического образца; входные клетки инкубируют при стимулирующих условиях, конструируют клетки с использованием векторных частиц, например, вирусных векторных частиц, для введения рекомбинантного полинуклеотида в клетки, например, путем трансдукции или трансфекции; культивирования сконструированных клеток, таких как, трансдуцированных клеток, например, с размножением клеток; и сбор, отделение и/или помещение клеток в контейнер, например, пакет или флакон, со всеми или с частью клеток, для получения выходной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки получаемой выходной композиции повторно вводят этому же субъекту до или после криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходные композиции сконструированных клеток пригодны для применения в терапии, например, при аутологичной клеточной терапии.

[0090] В конкретных вариантах осуществления предлагаемые способы используют для получения выходных композиций клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, из исходной или входной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения входную композицию изготавливают и/или получают путем объединения, смешивания и/или комбинирования клеток, включая композицию клеток, содержащую обогащенные Т-клетки, обогащенные CD4+ Т-клетки и обогащенные CD4+ Т-клетки, и/или обогащенные CD8+ Т-клетки (далее называемые также композициями обогащенных Т-клеток, композициями обогащенных CD4+ Т-клеток и композициями обогащенных CD8+ Т-клеток, соответственно). В некоторых вариантах осуществления входная композиция клеток представляет собой композицию комбинированных, смешанных и/или объединенных CD4+ и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы используют с достижением одной или нескольких целей: активации и/или стимуляции клеток, например, клеток входной композиции; генной инженерии активированных и/или стимулированных клеток, например, для введения полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок, путем трансдукции или трансфекции; и/или культивирования сконструированных клеток, например, в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления способы также могут быть использованы для целей выделения или отбора клеток из биологического образца для получения входной композиции

обогащенных Т-клеток, например из биологического образца, отобранного, взятого и/или полученного от субъекта. В конкретных вариантах осуществления предложенные способы могут быть использованы для целей получения композиций для приготовления и/или составления готовой к применению композиции обогащенных Т-клеток, после того, как клетки были инкубированы, активированы, стимулированы, сконструированы, трансдуцированы, трансфицированы и/или культивированы.

[0091] В некоторых вариантах осуществления инкубирование клеток в условиях стимуляции представляет собой или включает инкубирование клеток со стимулирующим реагентом, например стимулирующим реагентом, описанным здесь, например, в Разделе I-B-1. В конкретных вариантах осуществления совокупность клеток или фиксированное количество клеток, такое как количество клеток, превышающих по меньшей мере 100×10^6 клеток, инкубируют в условиях стимуляции при установленной или фиксированной концентрации, такой как концентрация менее чем 5×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления инкубирование предпочтительно проводят в течение установленного или фиксированного промежутка времени, такого как в течение 2 дней или в течение времени от 18 часов до 30 часов.

[0092] В некоторых вариантах осуществления способы, представленные здесь, выполняют с использованием методов генной инженерии, например, методов трансдукции или трансфекции клеток. В некоторых вариантах осуществления совокупность клеток или фиксированное количество клеток, например жизнеспособных CD4+ и CD8+ клеток, подвергают воздействию методов генной инженерии. В некоторых вариантах осуществления количество клеток, в количестве по меньшей мере 10×10^6 клеток, инкубируют при стимулирующих условиях при установленной или фиксированной концентрации, такой как концентрация менее чем 3×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструирование осуществляют в течение установленного или фиксированного промежутка времени, такого как в течение 2 дней или в течение от 18 часов до 30 часов.

[0093] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть стадии культивирования осуществляют при постоянном перемешивании и/или перфузии, например, в биореакторе закрытой системы. В некоторых вариантах осуществления смешивание и/или перфузия включает постоянную и/или постепенную замену использованной или старой среды или раствора на свежую среду или раствор. В некоторых вариантах осуществления культивирование инициируют в определенный период времени, например, через 2, 3, 4 или 5 дней после начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции; через 2, 3, 4 или 5 дней после смешивания, объединения и/или комбинирования клеток, например CD4+ и CD8+ клеток, для получения входной композиции; через 3, 4, 5 или 6 дней после отбора биологических проб; и/или через 3, 4, 5 или 6 дней после выделения, отбора и/или обогащения композиций обогащенных Т-клеток, например CD4+ и/или CD8+ Т-клеток из биологического образца.

[0094] В некоторых вариантах осуществления одну или несколько стадий процесса проводят по меньшей мере частично, в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда представляет собой известную и/или хорошо известную среду для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда представляет собой контролируемую культуральную среду, которая была обработана, например, отфильтрована для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит белки. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда может содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы присоединения.

[0095] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы выполняют таким образом, что одна, несколько или все стадии получения клеток для клинического применения, например, в адоптивной клеточной терапии, проводят без воздействия на клетки нестерильных условий. В некоторых вариантах осуществления такого способа клетки выделяют, отделяют или собирают, трансдуцируют, промывают, необязательно активируют или стимулируют и готовят в форме композиции в замкнутой системе. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько стадий выполняют вне закрытой системы или устройства. В некоторых таких вариантах осуществления композиции обогащенных клеток переносят из закрытой системы или устройства в стерильных условиях, например, путем стерильного переноса в отдельную замкнутую систему.

[0096] В конкретных вариантах осуществления изобретения композиции обогащенных Т-клеток могут быть собраны и приготовлены в виде композиции с криозащитой для криозаморозки и/или для хранения при температуре ниже 0°С, ниже -20°С или при температуре ниже -70°С или -80°С, до, во время или после любой стадии или стадий способа получения выходных композиций обогащенных Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы. В некоторых вариантах осуществления клетки могут храниться в течение некоторого времени в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней, или в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 недель или в течение периода времени по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или более чем 8 недель. После хранения композиции обогащенных Т-клеток могут быть размороженны, и обработка может быть возобновлена с той же самой точки процесса. В некоторых вариантах осуществления изобретения входные композиции обогащенных Т-клеток являются криогенными и их хранят перед дальнейшей обработкой, например, инкубированием в условиях стимуляции. В конкретных вариантах осуществления культивируемые и/или приготовленные композиции обогащенных Т-клеток являются криогенными и их хранят перед введением субъекту, например, в качестве средства аутологичной клеточной терапии.

[0097] В некоторых вариантах осуществления способы, представленные здесь, предусматривают выполнение процесса, посредством которого сконструированные клетки получают способом, который включает стадии инкубирования клеток в условиях стимуляции, трансдукции клеток для экспрессии рекомбинантного рецептора, например

CAR, и культивирования клеток в условиях, стимулирующих пролиферацию или размножение. В конкретных вариантах осуществления инкубирование проводят в течение от 18 до 30 часов, например, в течение или приблизительно в течение 24 часов, и трансдукцию затем проводят в течение от 18 до 30 часов, например, в течение или приблизительно в течение 24 часов. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях, которые обеспечивают стимуляцию и/или размножение, после того, как клетки были стимулированы и трансдуцированы. В некоторых вариантах осуществления проводят инкубирование, например, путем контактирования клеток со стимулирующим реагентом, и трансдукцию инициируют через 48 часов, в течение 36 часов или в течение 30 часов после начала инкубирования. В некоторых вариантах осуществления культивирование выполняют после инкубирования и трансдукции, и культивирование начинают в течение 72 часов, в течение 66 часов или в течение 60 часов после инкубирования. В некоторых вариантах осуществления культивирование осуществляют до тех пор, пока не будет достигнуто пороговое значение количества клеток, их плотности и/или уровня размножения клеток, по меньшей мере через один день после достижения порогового значения количества клеток, их плотности и/или уровня размножения клеток, и/или до по меньшей мере через 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней или 12 дней после начала инкубирования.

[0098] В некоторых вариантах осуществления на любой стадии или стадиях способа часть клеток может быть отобрана или собрана. Например, клетки могут быть отобраны из композиции обогащенных Т-клеток, в то время как вся композиция остается в замкнутой системе, например, во время выделения, инкубирования, выполнения генной инженерии, культивирования и/или приготовления конечной композиции. В некоторых вариантах осуществления такие клетки могут быть проанализированы для определения маркеров, признаков или характеристик, включая, но не ограничиваясь ими, показатели жизнеспособности, апоптоза, активации, стимуляции, роста и/или истощения. В некоторых вариантах осуществления клетки отбирают или собирают автоматизированным процессом, в то время как композиция обогащенных Т-клеток остается в замкнутой системе. В некоторых вариантах осуществления анализ отобранных или собранных клеток автоматизирован. В конкретных вариантах осуществления анализ проводят в закрытой системе в стерильных условиях.

[0099] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ, посредством которого получают сконструированные клетки, включающий стадии инкубирования входной композиции клеток в условиях стимуляции (например, для активации Т-клеток в композиции), воздействия на композицию клеток методов генной инженерии (например, трансдукции) для экспрессии рекомбинантного рецептора, например, CAR, культивирования клеток в условиях, стимулирующих пролиферацию или размножение клеток, и/или отбор или сбор клеток для получения композиции клеток, содержащей сконструированные клетки, например сконструированные Т-клетки для клеточной терапии. В некоторых вариантах

осуществления композицию входных клеток инкубируют при стимулирующих условиях, которые включают: соотношение стимулирующего реагента (например, реагента в виде шариков, как описано в Разделе I-B-1) и клеток, равного или приблизительно равного 1:1; где входная композиция содержит CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки в соотношении равном или приблизительно равном 1:1 (например, композиция, обогащенная CD4+ Т-клетками, и композиция, обогащенная CD8+ Т-клетками, может быть объединена, смешана и/или скомбинирована в соотношении равном или приблизительно равном 1:1 для получения входной композиции); общая продолжительность инкубирования в условиях стимуляции, например, со стимулирующим реагентом, составляет от приблизительно 12 часов до приблизительно 36 часов, например, от приблизительно 18 часов до приблизительно 30 часов; клетки, например клетки входной композиции, инкубируют в условиях стимуляции, таких как в присутствии стимулирующего реагента, при плотности от приблизительно 5×10^{10} клеток/мл до приблизительно 5×10^{10} клеток/мл, например, при плотности равной или приблизительно равной 3×10^{6} клеток/мл; и/или клетки, например клетки входной композиции, стимулируют и/или активируют в бессывороточной среде (например, в бессывороточной среде, содержащей один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как IL-2, IL-7 и IL-15). В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования в условиях, которые включают: (a) приведение клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, при центрифугировании, таком как спинокуляция (например, центробежная инокуляция), например, при приблизительно 1600 × g в течение приблизительно 60 минут; клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования при плотности от приблизительно 5×10^{5} клеток/мл до приблизительно 5×10^{7} клеток/мл, например, при плотности равной или приблизительно равной 1×10^{6} клеток/мл; приблизительно 100×10^{6} клеток из композиции, культивируемой при стимулирующих условиях, подвергают воздействию методами инженерного конструирования; общая продолжительность стадии конструирования методами генной инженерии, например трансдукции, составляет от приблизительно 12 часов до приблизительно 36 часов, например, от приблизительно 15 до приблизительно 16 часов, например, от приблизительно 12 часов до приблизительно 36 часов, например, от приблизительно 18 часов до приблизительно 30 часов; и/или клетки подвергают конструированию методами генной инженерии в бессывороточной среде (например, в бессывороточной среде, содержащей один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как IL-2, IL-7 и IL-15). В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях, которые стимулируют пролиферацию или размножение клеток, которые включают: культивирование клеток в условиях качания и/или перфузии; и/или клетки культивируют в бессывороточной среде (например, в бессывороточной среде, содержащей один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как IL-2, IL-7 и IL-15, необязательно с более высокими концентрациями рекомбинантных цитокинов, чем в

бессывороточной среде, используемой для стимуляции/активации и/или конструирования методами генной инженерии). В некоторых вариантах осуществления культивирование заканчиваю, и клетки собирают, когда клетки достигают порогового значения концентрации и/или размножения, например, порогового количества клеток (например, общего количества нуклеированных клеток), составляющего по меньшей мере приблизительно 3500×10^6 клеток или приблизительно 5500×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, когда клетки не достигли целевых показателей или порога в заданное время во время процессов стимуляции/активации, инженерии, культивирования и/или сбора, клетки могут быть стимулированы/активированы, подвергнуты воздействию методами генной инженерии и/или культивированы до более позднего момента времени, когда будет достигнут целевой показатель или пороговый уровень.

[0100] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ, посредством которого получают сконструированные клетки, включающий стадии инкубирования входной композиции клеток в условиях стимуляции (например, для активации Т-клеток в композиции), воздействия на композицию клеток методами генной инженерной (например, трансдукции) для экспрессии рекомбинантного рецептора, например, CAR, культивирования клеток в условиях, стимулирующих пролиферацию или размножение клеток, и/или сбор или отбор клеток для получения композиции клеток, содержащей сконструированные клетки, например сконструированные Т-клетки для клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления композицию входных клеток инкубируют при стимулирующих условиях, которые включают: соотношение стимулирующего реагента (например, такого, как описано в Разделе I-B-1) и клеток равно или приблизительно равно 1:1; входная композиция сдержит CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки в соотношении равном или приблизительно равном 1:1 (например, композиция, обогащенная CD4+ Т-клетками, и композиция, обогащенная CD8+ Т-клетками, может быть объединена, смешана и/или скомбинирована в соотношение равном или приблизительно равном 1:1 для получения входной композиции); общая продолжительность инкубирования при стимулирующих условиях, например, со стимулирующим реагентом, составляет от приблизительно 12 часов до приблизительно 36 часов, например, от приблизительно 18 часов до приблизительно 30 часов; клетки, например клетки входной композиции, инкубируют при стимулирующих условиях, таких как в присутствии стимулирующего реагента, при плотности от приблизительно 5×10^5 клеток/мл до приблизительно 5×10^7 клеток/мл, например, при плотности приблизительно равной 3×10^6 клеток/мл; и/или клетки, например клетки входной композиции, стимулируют и/или активируют в бессывороточной среде (например, в бессывороточной среде, содержащей один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как IL-2, IL-7 и IL-15). В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают воздействию методами генной инженерии в условиях, которые включают: контактирование клеток с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, при

центрифугировании, таком как спинокуляция (например, центробежная инокуляция), например, при приблизительно 1600 × g в течение приблизительно 60 минут; клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования при плотности от приблизительно 5×10^5 клеток/мл до приблизительно 5×10^7 клеток/мл, например, при плотности равной или приблизительно равной 1×10^6 клеток/мл; приблизительно 100×10^6 клеток из композиции, культивируемой при стимулирующих условиях, подвергают воздействию методами инженерного конструирования; общая продолжительность воздействия методами генной инженерии, например, трансдукции, составляет от приблизительно 12 часов до приблизительно 36 часов, например, от приблизительно 18 часов до приблизительно 30 часов; и/или клетки подвергают воздействию методами генной инженерии в бессывороточной среде (например, бессывороточной среде, содержащей один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как IL-2, IL-7 и IL-15). В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях, которые стимулируют пролиферацию или размножение клеток, которые включают: культивирование клеток в условиях качания и/или перфузии; и/или клетки культивируют в бессывороточной среде (например, бессывороточной среде, содержащей один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как IL-2, IL-7 и IL-15), необязательно с более высокими концентрациями рекомбинантных цитокинов, чем в бессывороточной среде используемой для стимуляции/активации и/или на стадии воздействия методами генной инженерии). В некоторых вариантах осуществления культивирование заканчивают, и клетки собирают, когда они достигают пороговых показателей значений количества, концентрации и/или размножения, например, порогового количества клеток (например, общего числа нуклеированных клеток), составляющего по меньшей мере приблизительно 2400×10^6 клеток, и когда клетки достигают порогового значения жизнеспособности, например, когда по меньшей мере приблизительно 75% или по меньшей мере приблизительно 85% клеток являются жизнеспособными. В некоторых вариантах осуществления, когда клетки не достигли целевых показателей или порога в заданное время во время процессов стимуляции/активации, инженерии, культивирования и/или сбора, клетки могут быть стимулированы/активированы, подвергнуты воздействию методами генной инженерии и/или культивированы до более позднего момента времени, когда будет достигнут целевой показатель или пороговый уровень.

[0101] В некоторых вариантах осуществления клетки или композиции клеток, которые получают и/или обрабатывают предлагаемыми способами, могут сравниваться с клетками или композициями клеток обработанных или полученных иллюстративным и/или альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления альтернативный и/или иллюстративный способ может отличаться одним или несколькими конкретными аспектами, но в остальном содержит аналогичные или одинаковые признаки, аспекты, операции, стадии, реагенты и/или условия вариантов осуществления или аспектов предлагаемых способов. Например, когда представленные способы используют для инкубирования клеток в присутствии реагента, такие клетки могут сравниваться с

клетками, которые не инкубированы с реагентом в иллюстративном и/или альтернативном способе. В некоторых вариантах осуществления, если не указано иное, предложенные способы и иллюстративные и/или альтернативные способы в других отношениях являются сходными и/или идентичными, например, с аналогичными или идентичными стадиями выделения, отбора, обогащения, активации, стимуляции, инженерии, трансфекции, трансдукции, культивирования и/или приготовления конечной композиции. В некоторых вариантах осуществления, если не указано иное, предложенные способы и альтернативные способы включают выделение, отбор и/или обогащение клеток из тех же или аналогичных типов биологических образцов и/или проводят обработку клеток и/или входных клеток для одного и того же типа клеток.

[0102] Также предложены клетки и композиции, полученные предложенными способами, включая фармацевтические композиции и препараты, а также наборы, системы и устройства для осуществления способов. Также предлагаются способы применения клеток и композиций, полученных способами, включая терапевтические способы, такие как способы адоптивной клеточной терапии, и фармацевтические композиции для введения субъектам.

A. Образцы и композиции клеток

[0103] В конкретных вариантах осуществления предложенные способы предусматривают выделение, отбор и/или обогащение клеток из биологического образца для получения одной или нескольких входных композиций обогащенных клеток, например Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают выделение клеток или их композиций из биологических образцов, таких как те, которые получены из или от субъекта, такого, как имеющего конкретное заболевание или состояние, или нуждающаяся в клеточной терапии, или в отношении которого будет проведена клеточная терапия. В некоторых аспектах субъект является человеком, таким как пациентом, нуждающийся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, обрабатывают и/или конструируют. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой первичные клетки, например первичные клетки человека. Образцы включают ткань, жидкую среду и другие образцы, взятые непосредственно у субъекта. Биологический образец может представлять собой образец, полученный непосредственно из биологического источника или образца, который подвергают обработке. Биологические образцы включают, без ограничения, жидкости организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая обработанные образцы, полученные из них.

[0104] В некоторых аспектах образец представляет собой кровь или образец, полученный из крови, или представляет собой продукт афереза или лейкаферза или образец получен из продукта афереза или лейкаферза. Примеры образцов включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию тканей, ткани опухоли, включая лейкоз и лимфому, ткани

лимфатического узла, лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником, слизистую оболочку, связанную с лимфоидной тканью, ткани селезенки, другие лимфоидные ткани, ткани печени, легкого, желудка, кишечника, ободочной кишки, почки, поджелудочной железы, ткани грудной клетки, костные ткани, ткани простаты, шейки матки, яичек, яичников, миндалин или других органов и/или клетки, происходящие из них. В контексте клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии, образцы включают образцы из аутологичных и аллогенных источников.

[0105] В некоторых примерах клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, путем афереза или лейкаферза. В некоторых аспектах образцы содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие нуклеированные белые кровяные клетки, красные кровяные клетки и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах образцы содержат клетки, отличные от красных кровяных клеток и тромбоцитов.

[010^6] В некоторых вариантах осуществления клетки крови, полученные от субъекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы, и клетки помещают в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS). В некоторых вариантах осуществления промывочный раствор не содержит кальций и/или магний и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах стадия промывки представляет собой полуавтоматизированное проточное центрифугирование, выполняемое согласно инструкциям производителя (например, с использованием процессора для обработки клеток Cobe 2991, Baxter). В некоторых аспектах стадию промывки выполняют посредством фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) в соответствии с инструкциями производителя установки. В некоторых вариантах осуществления клетки после промывания ресуспендируют в различных биосовместимых буферах, таких как, например, свободный от Ca^{2+}/Mg^{2+} PBS. В некоторых вариантах осуществления компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде.

[0107] В некоторых вариантах осуществления способы получения включают стадии замораживания, например, криоконсервирования клеток, либо до, либо после выделения, отбора и/или обогащения, и/или инкубирования для трансдукции и конструирования. В некоторых вариантах осуществления стадия замораживания и последующего оттаивания удаляет в клеточной популяции гранулоциты и, в некоторой степени, моноциты. В некоторых вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для замораживания, например, после стадии промывки для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах могут быть использованы любые известные растворы для замораживания и параметры замораживания. В некоторых вариантах осуществления клетки замораживают, например, криогенным способом или способом криоконсервированния, в среде и/или растворе с конечной концентрацией равной или приблизительно равной 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9,0%, 8,5%,

8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5% или 5,0% DMSO; или от по меньшей мере приблизительно 1% и до по меньшей мере приблизительно 15%, от по меньшей мере приблизительно 6% и до по меньшей мере приблизительно 12%, от по меньшей мере приблизительно 5% и до по меньшей мере приблизительно 10%, или от приблизительно 6% и до по меньшей мере приблизительно 8% DMSO. В конкретных вариантах осуществления клетки замораживают, например, криогенным способом или способом криоконсервирования, в среде и/или растворе с конечной концентрацией равной или приблизительно равной 5,0%, 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,25%, 1,0%, 0,75%, 0,5% или 0,25% HSA, или от 0,1% до 5%, от 0,25% до 4%, от 0,5% до 2%, или от 1% до 2% HSA. Один из примеров включает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточного альбумина человека (HSA), или других подходящих сред для замораживания клеток. Затем их разбавляют 1:1 с помощью среды, так что конечная концентрация DMSO и HSA составляет 10% и 4%, соответственно. Затем клетки обычно замораживают до или приблизительно до -80°C со скоростью равной или приблизительно равной 1° в минуту, и хранят в газовой фазе резервуара для хранения жидкого азота.

[0108] В некоторых вариантах осуществления выделение клеток или популяций клеток включает одну или несколько стадий обработки и/или неаффинной хроматографии клеток. В некоторых примерах клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или нескольких реагентов, например реагентов для удаления нежелательных компонентов, обогащения требуемых компонентов, лизиса или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах клетки разделяют на основе одного или нескольких свойств, таких как плотность, адгезионные свойства, размер, чувствительность и/или устойчивость к конкретным компонентам. В некоторых вариантах осуществления способы включают способы разделения клеток на основе плотности, такие как получение белых кровяных клеток из периферической крови путем лизиса красных кровяных клеток и центрифугирования в градиенте перколла или фиколла.

[0109] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть стадии отбора клеток включает инкубирование клеток с реагентом для отбора. Инкубирование с реагентом или реагентами для отбора, например, как часть способов отбора, могут быть осуществлены с использованием одного или нескольких реагентов для отбора одного или нескольких различных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или нескольких специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например поверхностных белков, внутриклеточных маркеров или нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления может быть использован любой известный способ с использованием реагента для отбора или реагентов для разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления реагент или реагенты для отбора приводят к разделению, которое представляет собой аффинное или иммуноаффинное разделение. Например, отбор в некоторых аспектах включает инкубирование с реагентом или реагентами для разделения клеток и клеточных популяций на основе экспрессии или

уровня экспрессии одного или нескольких маркеров, как правило, маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубирования с антителом или партнером связывания, который специфически связывается с такими маркерами, с последующими стадиями промывки и разделения клеток, связанных с антителом или партнером связывания, от тех клеток, которые не связаны с антителом или партнером связывания.

[0110] В некоторых аспектах таких процессов определенный объем клеток смешивают с необходимым количеством желаемого реагента для отбора на основе их аффинности. Иммуноаффинный отбор может быть проведен с использованием любой системы или способа, которые приводят к благоприятному энергетическому взаимодействию между разделенными клетками и молекулой, специфически связывающейся с маркером на клетке, например антителом, или с другим связывающим партнером на твердой поверхности, например на частице. В некоторых вариантах осуществления способы выполняются с использованием частиц, таких как шарики, например магнитные шарики, которые покрыты агентом для отбора (например, антителом), специфичным к маркеру клеток. Частицы (например, шарики) могут быть инкубированы или смешаны с клетками в контейнере, таком как трубка или пакет, при встряхивании или смешивании, с постоянным соотношением плотности клеток к частицам (например, шарикам) для способствования энергетически благоприятному взаимодействию. В других случаях способы включают выбор клеток, в которых весь или часть процесса отбора осуществляют во внутренней полости центрифужной камеры, например, при центробежном вращении. В некоторых вариантах осуществления инкубирование клеток с реагентами для отбора, такими как реагенты для иммуноаффинного отбора, осуществляют в центрифужной камере. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделение или разделение проводят с использованием системы, устройства или устройства, описанного в публикации международной патентной заявки WO 2009/072003 или в заявке US 20110003380 A1. В одном примере система представляет собой систему, описанную в международной публикации WO 2016/073602.

[0111] В некоторых вариантах осуществления при проведении таких стадий отбора или их частей (например, инкубирования с частицами, покрытыми антителом, например магнитными шариками) в полости центрифужной камеры, пользователь может управлять определенными параметрами, такими как объем различных растворов, добавлять раствор в различные периоды времени во время обработки, что может обеспечить преимущества по сравнению с другими известными способами. Например, уменьшение объема жидкости в полости центрифужной камеры во время инкубирования может увеличить концентрацию частиц (например, шариков с реагентом), используемого при отборе, и, таким образом, увеличивая химический потенциал раствора, не влияя на общее количество клеток в полости. Это, в свою очередь, может усилить попарное взаимодействие между обрабатываемыми клетками и частицами, используемыми для отбора. В некоторых вариантах осуществления при проведении стадии инкубирования в

камере, например, при взаимодействии с системами, схемами и управлением, как описано здесь, пользователь может осуществлять перемешивание раствора в нужное время во время инкубирования, что также может улучшить взаимодействие.

[0112] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть стадии отбора проводят в центрифужной камере, где эта часть стадии включает инкубирование клеток с реагентом для отбора. В некоторых аспектах таких процессов определенный объем клеток смешивают с желаемым количеством реагента отбора, действующего на основе аффинности, количество которого гораздо меньше, чем обычно используется при осуществлении аналогичных вариантов выбора в пробирке или контейнере, для отбора одного и того же количества клеток и/или объема клеток в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления количество реагента или реагентов для отбора составляет не более чем по меньшей мере приблизительно 5%, не более чем приблизительно 10%, не более чем приблизительно 15%, не более чем приблизительно 20%, не более чем приблизительно 25%, не более или приблизительно 50%, не более чем приблизительно 60% или приблизительно 60%, не более чем или приблизительно 70%, или не более чем приблизительно 80% от количества этого же реагента (реагентов) для отбора, используемого для отбора клеток в пробирке или в контейнере для инкубирования того же количества клеток и/или такого же объема клеток в соответствии с инструкциями производителя.

[0113] В некоторых вариантах осуществления для отбора, например, основанного на иммуноаффинном отборе клеток, клетки инкубируют в полости камеры в виде композиции, которая также содержит буфер для отбора с реагентом для отбора, таким как молекула, которая специфически связывается с поверхностным маркером на клетке, которую желательно обогатить и/или истощить, но не на других клетках в композиции, таком как антитело, которое необязательно присоединено к каркасу, такому как полимер или поверхность, например, частицы, например, к магнитным шарикам, таким как магнитные шарики, связанные с моноклональными антителами, специфическими для CD4 и CD8. В некоторых вариантах осуществления, как описано здесь, реагент для выбора добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое значительно меньше, чем соответствующее количество, или приблизительно меньше соответствующего количества (например, не более чем или приблизительно менее 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80%), по сравнению с количеством реагента для отбора, который обычно используется, или должен быть использован для достижения такой же или подобной эффективности отбора такого же количества клеток или такого же объема клеток, когда отбор проводят в пробирке при встряхивании или вращении. В некоторых вариантах осуществления инкубирование осуществляют с добавлением буфера для отбора к клеткам и реагенту для отбора до достижения целевого объема при инкубировании с реагентом, например по меньшей мере от приблизительно 10 мл до по меньшей мере приблизительно 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 добавляют к клеткам по-отдельности. В некоторых вариантах осуществления отбор проводят при периодическом небольшом пермешивании, что может способствовать увеличению энергетически благоприятных взаимодействий, позволяя тем самым использовать меньшее количество реагента для отбора при достижении высокой эффективности отбора.

[0114] В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность инкубирования с реагентом для отбора составляет от приблизительно 5 минут до приблизительно 6 часов, например от 30 минут до 3 часов, например, по меньшей мере или по приблизительно меньшей мере 30 минут, 60 минут, 120 минут или 180 минут.

[0115] В некоторых вариантах осуществления инкубирование обычно проводят в условиях перемешивания, таких как при перемешивании с вращением, обычно при относительно низкой силе или скорости. При этом скорость ниже, чем скорость, используемая для осаждения клеток, например, от или от приблизительно 600 об/мин до или приблизительно до 1700 об/мин (например, от или приблизительно от, или по меньшей мере 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин или 1700 об/мин), например, при RCF в образце или у стенок камеры или другой емкости от или от приблизительно 80 г до 100 г (например, по меньшей мере, 80 г, 85 г, 90 г, 95 г или 100 г). В некоторых вариантах осуществления вращение выполняют с использованием повторяющихся периодов вращения при низкой скорости с последующим периодом покоя, такими как вращение и/или покой в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, как вращение в течение приблизительно 1 или 2 секунды с последующим периодом покоя приблизительно в течение 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0116] В некоторых вариантах осуществления такой процесс выполняют в полностью закрытой системе, в которую встроена камера как одно целое с системой. В некоторых вариантах осуществления этот процесс (и в некоторых аспектах также одна или несколько дополнительных стадий, таких как предыдущая стадия промывки, промывки образца, содержащего клетки, такого как образца афереза) осуществляют автоматически, так что клетки, реагент и другие компоненты вводятся в камеру и выводят из нее в соответствующие моменты времени, и для завершения стадии промывки и связывания центрифугирование проводят в единой закрытой системе с использованием автоматизированной программы.

[0117] В некоторых вариантах, после инкубирования и/или смешивания клеток и реагента и/или реагентов для отбора инкубированные клетки подвергают разделению для отбора клеток на основе присутствия или отсутствия конкретного реагента или реагентов. В некоторых вариантах осуществления разделение осуществляют в той же закрытой системе, в которой проводят инкубирование клеток с реагентом для отбора. В некоторых вариантах осуществления после инкубирования с реагентами для отбора инкубированные клетки, включая клетки, с которыми связан реагент для отбора, переносят в систему

разделения клеток на основе иммуноаффинной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления система разделения на основе иммуноаффинной хроматографии представляет собой или содержит магнитную сепарационную колонну.

[0118] Такие стадии разделения могут быть основаны на положительном отборе, в котором клетки, связанные с реагентами для отбора, например с антителом или партнером связывания, сохраняют для дальнейшего использования, и/или на негативном отборе, в котором клетки, не связанные с реагентом, например антителом или партнером связывания, сохраняют. В некоторых примерах обе фракции сохраняют для дальнейшего использования. В некоторых аспектах негативный отбор может быть особенно полезным, когда не доступно антитело, которое специфически связывается с конкретным типом клеток в гетерогенной популяции, и разделение лучше всего проводить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от желаемых клеток в популяции.

[0119] В некоторых вариантах осуществления стадии способа дополнительно включают негативный и/или положительный отбор инкубированных клеток, например, с использованием системы или устройства, которые могут выполнять отбор на основе аффинности. В некоторых вариантах осуществления отделение осуществляют путем обогащения конкретной клеточной популяции путем положительного отбора или истощения конкретной клеточной популяции путем негативного отбора. В некоторых вариантах осуществления положительный или негативный отбор осуществляют путем инкубирования клеток с одним или несколькими антителами или другим связывающим агентом, который специфически связывается с одним или несколькими экспрессируемыми поверхностными маркерами (маркер$^{+}$), или экспрессируемыми на относительно более высоком уровне (маркер^{high}) на положительно или негативно отобранных клетках, соответственно.

[0120] Разделение не должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной клеточной популяции или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительный отбор или обогащение клеток конкретного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к увеличению числа или процентной доли таких клеток, но не приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Подобным образом, негативный отбор, удаление или истощение клеток конкретного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к уменьшению количества или процентной доли таких клеток, но не приводит к полному удалению всех таких клеток.

[0121] В некоторых примерах осуществляют несколько циклов стадий разделения, где положительно или негативно отобранную фракцию с одной стадии подвергают другой стадии разделения, такой как последующий положительный или негативный отбор. В некоторых примерах одна стадия разделения может истощать клетки, экспрессирующие несколько маркеров одновременно, например, инкубируя клетки с несколькими антителами или партнерами связывания, каждый из которых специфичен для маркера, предназначенного для негативного отбора. Подобным образом, множество типов клеток может одновременно быть положительно отобрано путем инкубирования клеток с

множеством антител или партнеров связывания, экспрессированных на различных типах клеток. В некоторых вариантах осуществления стадии разделения повторяются и/или выполняются более чем один раз, где положительно или негативно отобранная фракция с одной стадии подвергают той же стадии разделения, такой как повторяющийся положительный или негативный отбор. В некоторых примерах одну стадию разделения повторяют и/или проводят более одного раза, например, чтобы увеличить чистоту выбранных клеток и/или дополнительно удалить и/или истощить негативно отобранные клетки из негативноотобранной фракции. В некоторых вариантах осуществления одну или несколько стадий разделения выполняют два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз или более чем десять раз. В некоторых вариантах осуществления одну или несколько стадий отбора проводят и/или повторяют от одного до десяти раз, от одного до пяти раз, или от трех до пяти раз.

[0122] Например, в некоторых аспектах конкретные субпопуляции Т-клеток, такие как клетки, положительные по маркерам или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD95+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клетки, выделяют с помощью методов положительного или негативного отбора. В некоторых вариантах осуществления такие клетки отбирают инкубированием с одним или несколькими антителами или партнерами связывания, которые специфически связываются с такими маркерами. В некоторых вариантах антитело или партнер связывания для осуществления отбора может быть конъюгирован, например, непосредственно или косвенно, с твердым носителем или матрицей, таким как магнитный шарик или парамагнитный шарик. Например, CD3+, CD28+ Т-клетки могут быть положительно отобраны с использованием анти-CD3/анти-CD28-конъюгированных магнитных шариков (например, шариков DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander и/или ExpACT®).

[0123] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки отделяют от образца PBMC путем негативного отбора по маркерам, экспрессируемых на клетках, которые не являются Т-клетками, такими как В-клетки, моноциты или другие лейкоциты, такие как CD14. В некоторых аспектах стадию селекции CD4+ или CD8+ клеток используют для разделения CD4+ хелперных и CD8+ цитотоксических Т-клеток. Такие CD4+ и CD8+ популяции могут быть далее отсортированы в субпопуляции положительным или негативным отбором по маркерам, экспрессируемым или экспрессируемым в относительно более высокой степени на одной или более субпопуляциях «наивных» Т-клеток, Т-клеток с памятью и/или эффекторных Т-клеток.

[0124] В некоторых вариантах осуществления CD8+ клетки дополнительно обогащены или истощены по «наивным» клеткам, клеткам с центральной памятью, эффекторной памятью и/или стволовым клеткам с центральной памятью, положительным или негативным отбором на основе поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления обогащение Т-клеток с центральной памятью (T_{CM}) проводят для повышения эффективности, например,

для улучшения долговременного выживания, размножения и/или приживления после введения, что в некоторых аспектах является особенно важным в таких субпопуляциях. См. например, Terakura et al. (2012) Blood 1:72-82; Wang et Al. (2012) J Immunother. 35 (9):689-70. В некоторых вариантах осуществления комбинирование T_{CM}-обогащенных CD8+ Т-клеток и CD4+ Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

[0125] В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетки памяти присутствуют как в CD62L+, так и в CD62L-подмножествах CD8+ лимфоцитов периферической крови. PBMC могут быть обогащены или истощены по CD62L-CD8+ и/или CD62L+CD8+ фракциям, с использованием анти-CD8- и анти-CD62L-антител.

[0126] В некоторых вариантах осуществления обогащение Т-клеток с центральной памятью (T_{CM}) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD27, CD28, CD95, CD3 и/или CD127; в некоторых аспектах оно основано на негативном отборе клеток, экспрессирующих или высокоэкспрессирующих CD45RA и/или гранзим В. В некоторых аспектах выделение популяции CD8+, обогащенной T_{CM}-клетками, проводят истощением клеток, экспрессирующих CD4, CD14, CD45RA, и положительным отбором или обогащением клеток, экспрессирующих CD62L. В одном аспекте обогащение Т-клеток с центральной памятью (T_{CM}) осуществляют, начиная с фракции клеток, негативно отобранных на основе экспрессии CD4, которую подвергают негативному отбору по экспрессии CD14 и CD45RA и положительному отбору по CD62L. Такие варианты отбора в некоторых аспектах выполняют одновременно, а в других аспектах осуществляют последовательно, в любом порядке. В некоторых аспектах стадию селекции на основе экспрессии CD4, используемую при получении популяции или субпопуляции CD8+, также используют для получения популяции или субпопуляции CD4+ клеток, так что как положительные, так и негативные фракции разделения по CD4 сохраняются и используются на последующих стадиях способов, необязательно после одной или нескольких дополнительных положительных или негативных стадий селекции (отбора). В некоторых вариантах осуществления отбор популяции CD4+ клеток и отбор популяции CD8+ клеток проводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления отбор популяции CD4+ клеток и отбор популяции CD8+ клеток проводят последовательно в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления способы отбора клеток могут включать способы, описанные в опубликованной заявке на патент США. No US 20170037369. В некоторых вариантах осуществления отобранная популяция CD4+ клеток и отобранная популяция CD8+ клеток могут быть объединены или скомбинированы после выбора. В некоторых аспектах отобранная популяция CD4+ клеток и отобранная CD8+ популяция клеток могут быть объединены в биореакторе, как описано здесь.

[0127] В некоторых вариантах выполнения CD8+ клетки центральной памяти представляют собой CD27+, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD45RA-и/или CD45RO+ клетки. В некоторых вариантах выполнения CD8+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+ и CD45RO+ клетки. В некоторых вариантах CD8+ клетки центральной памяти

представляют собой CCR7+ и CD45RO+ клетки. В некоторых вариантах выполнения CD8+ клетки центральной памяти представляют собой CCR7+ и CD45RA- клетки. В некоторых вариантах осуществления CD8+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+ и CCR7 клетки+. В некоторых вариантах осуществления CD8+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+/CD45RA-, CCR7+/CD45RA-, CD62L+/CCR7+ или CD62L+/CCR7+/CD45RA- клетки, и они имеют уровень экспрессией CD44 от среднего до высокого. В некоторых вариантах осуществления CD8+ клетки центральной памяти представляют собой CD27+/CD28+/CD62L+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CCR7+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+ или CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+/CD45RA- клетки.

[0128] В конкретных вариантах осуществления биологический образец, например образец PBMC или других лейкоцитов, подвергают отбору (селекции) в отношении CD4+ Т-клеток, где как негативные, так и положительные фракции сохраняются. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки получают из негативная фракция. В некоторых вариантах осуществления биологический образец подвергают отбору в отношении CD8+ Т-клеток, сохраняя как негативные, так и положительные фракции. В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетки получают из негативной фракции.

[0129] В конкретном примере образец PBMC или другой образец лейкоцитов подвергают селекции в отношении CD4+ клеток, сохраняя как негативные, так и положительные фракции. Затем негативную фракцию подвергают негативному отбору по экспрессии CD14 и CD45RA или CD19, а положительный отбор выполняют на основе наличия маркеров Т-клеток с центральной памятью, таких как CD62L или CCR7, где положительные и негативные отборы проводят в любом порядке.

[0130] В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-хелперные клетки сортируют на наивные клетки, клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций, которые имеют антигены клеточной поверхности. CD4+ лимфоциты могут быть получены стандартными методами. В некоторых вариантах осуществления наивные CD4+ Т-лимфоциты представляют собой CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ или CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+ и CD45RO+ клетки. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CD27+, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD45RA- и/или CD45RO+ клетки. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+ и CD45RO+ клетки. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CCR7+ и CD45RO+ клетки. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CCR7+ и CD45RA- клетки. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+ и CCR7+ клетки. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+/CD45RA-, CCR7+/CD45RA-, CD62L+/CCR7+ или CD62L+/CCR7+/CD45RA- клетки, и они имеют

уровень экспрессией CD44 от среднего до высокого. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CD27+/CD28+/CD62L+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CCR7+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+ или CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+/CD45RA- клетки. В некоторых вариантах осуществления эффекторные CD4+ клетки представляют собой CD62L- и CD45RO- клетки.

[0131] В одном примере обогащения CD4+ клеток негативным отбором набор моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах антитело или партнер связывания связан с твердым носителем или матрицей, такой как магнитный шарик или парамагнитный шарик, для обеспечения разделения клеток для положительного и/или негативного отбора. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки и клеточные популяции отделяют или выделяют с использованием иммуномагнитных (или аффинных) методов Разделения (см. обзор 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).

[0132] В некоторых аспектах инкубированный образец или композиция клеток, подлежащих разделению, инкубируют с реагентом для отбора, содержащим небольшие, намагничивающиеся или магнитно-чувствительные материалы, такие как магнитно-чувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные шарики (например, такие как шарики Dynalbeads или MACS®). Магнитно-чувствительный материал, например частица, обычно непосредственно или опосредованно присоединена с партнером связывания, например, с антителом, которое специфически связывается с молекулой, например поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или в популяции клеток, которые желательно разделить, например, негативным или положительным отбором.

[0133] В некоторых вариантах осуществления изобретения магнитная частица или шарик включает магнитно-чувствительный материал, связанный со специфически связывающим элементом, таким как антитело или другой партнер связывания. Существует много хорошо известных магнитно-чувствительных материалов, используемых в способах магнитной сепарации. Подходящие магнитные частицы включают те, которые описаны в патенте США US 4452773, и в Европейском патенте EP 452342 B, которые включены в настоящее описание посредством ссылки. Частицы коллоидного размера, такие как частицы, описанные в патенте США US 4795698 и в Liberti et al., патент США US 5200084, являются другими примерами частиц.

[0134] Инкубирование обычно проводят в условиях, при которых антитела или партнеры связывания, или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты, которые специфически связываются с такими антителами или партнерами связывания, присоединенными к магнитной частице или частицам, специфически связываются с молекулами клеточной поверхности, если они присутствуют на клетках в образце.

[0135] В некоторых вариантах осуществления магнитно-чувствительные частицы покрыты первичными антителами или другими партнерами связывания, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления магнитные частицы прикрепляются к клеткам за счет покрытия из первичных антител, специфичных для одного или нескольких маркеров. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, а не шарики, метят первичным антителом или партнером связывания, а затем добавляют специфичные к типу клеток вторичные антитела или другие партнеры связывания (например, стрептавидин) на магнитных частицах. В некоторых вариантах осуществления покрытые стрептавидином магнитные частицы используют в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

[0136] В некоторых аспектах разделение достигается в процедуре, где образец помещают в магнитное поле, и клетки с прикрепленными к ним магнитными или намагничивающиесями частицами, притягиваются к магниту и отделяются от немеченых клеток. Для положительного отбора клетки, которые притягиваются к магниту, сохраняются; для негативного отбора клетки, которые не притягиваются (немеченные клетки), сохраняются. В некоторых аспектах комбинацию положительного и негативного отбора выполняют на той же стадии отбора, где положительные и негативные фракции сохраняются и дополнительно обрабатываются или подвергаются дальнейшим стадиям разделения.

[0137] В некоторых вариантах осуществления отбор на основе аффинности осуществляется посредством сортировки с помощью магнитных активированных клеток (MACS) (Miltenyi Biotech, Aubury, CA). Сортировка с использованием магнитных активированных клеток (MACS), например, с использованием системы CliniMACS, позволяет получать очень чистый набор клеток с прикрепленными к ним намагниченными частицами. В некоторых вариантах осуществления сортировку MACS выполняют в режиме, в котором нецелевые и целевые виды последовательно элюируются после воздействия внешнего магнитного поля. Таким образом, клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, в то время как незакрепленные частицы элюируются. Затем, после завершения этой первой стадия элюирования, частицы, которые были захвачены магнитным полем и защищены от вымывания, освобождаются, и таким образом они могут быть элюированы и извлечены. В некоторых вариантах осуществления клетки, не являющиеся мишенями, помечены и истощены из гетерогенной популяции клеток.

[0138] В некоторых вариантах осуществления магнитно-чувствительные частицы оставляют прикрепленными к клеткам, которые затем впоследствии инкубируют, культивируют и/или подвергают генно-инженерному конструированию; в некоторых аспектах частицы оставляют прикрепленными к клеткам и при введении пациенту. В некоторых вариантах осуществления намагничивающиеся или магниточувствительные частицы отделяют от клеток. Способы отделения и удаления намагничивающихся частиц

из клеток известны, и они включают, например, применение конкурирующих немеченных антител, намагничивающихся частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами, и т.п. В некоторых вариантах осуществления намагничивающиеся частицы являются биоразлагаемыми.

[0139] В некоторых аспектах разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматического отделения клеток на уровне клинической чистоты в закрытой и стерильной системе. Компоненты системы могут включать встроенный микрокомпьютер, блок магнитной сепарации, перистальтический насос и различные перепускающие клапаны. В некоторых аспектах встроенный компьютер управляет всеми компонентами аппарата и управляет системой для выполнения повторных процедур в стандартизированной последовательности. Блок магнитной сепарации в некоторых аспектах включает подвижный постоянный магнит и держатель для колонки. Перистальтический насос управляет скоростью потока по всей системе трубок, и вместе с перепускными клапанами обеспечивает управление потоков буфера и непрерывного потока суспензии клеток через систему.

[0140] В некоторых аспектах в системе CliniMACS используются связанные с антителами намагничивающиеся частицы, которые подаются в стерильный апирогенный раствор. В некоторых вариантах после мечения клеток магнитными частицами, эти клетки промывают для удаления избытка частиц. Затем пакет/мешок с препаратом клеток соединяют с набором трубок, которые, в свою очередь, соединяют с мешком, содержащим буфер, и мешком для сбора клеток. Комплект трубок состоит из предварительно собранных стерильных трубок, соединенных с предварительной колонкой и разделительной колонкой, и он предназначен только для разового использования. После запуска программы разделения, система автоматически направляет пробу клеток в разделительную колонку. Меченые клетки удерживаются внутри колонки, в то время как немеченые клетки удаляются серией промывок. В некоторых вариантах осуществления клеточные популяции, используемые в рамках описанных здесь способов, являются немечеными и не удерживаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления клеточные популяции, используемые в рамках описанных здесь способов, являются мечеными, и они удерживаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления клеточные популяции, используемые в рамках описанных здесь способов, элюируют из колонки после удаления магнитного поля, и их собирают в мешок для сбора клеток.

[0141] В некоторых вариантах осуществления разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy в некоторых аспектах снабжена блоком обработки клеток, который обеспечивает автоматическую промывку и фракционирование клеток центрифугированием. Система CliniMACS Prodigy может также включать встроенную камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, позволяющие определять оптимальную конечную точку процесса фракционирования клеток путем

распознавания макроскопических слоев продуктов из клеток. Например, периферическая кровь автоматически разделяется на слои, содержащие эритроциты, белые кровяные клетки и плазму. Система CliniMACS Prodigy может также включать встроенную камеру для контроля культивирования клеток, которая обеспечивает выполнение протоколов культивирования клеток, таких как, например, протоколы дифференцировки и размножения клеток, загрузки антигена и длительного культивирования клеток. Входные порты обеспечивают стерильное удаление и пополнение среды и клеток, и контроль этих процессов осуществляется с использованием встроенного микроскопа (см., например, Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35 (9):651-660, Terakura et Al. (2012) Blood 1:72-82 и Wang Et Al. (2012) J Immunother. 35 (9):689-701).

[0142] В некоторых вариантах осуществления клеточную популяцию, описанную здесь, собирают и обогащают (или истощают) проточной цитометрией, где клетки, окрашенные в отношении поверхностных маркеров клеток, переносят в струйный поток. В некоторых вариантах осуществления клеточную популяцию, описанную здесь, собирают и обогащают (или обедняют) с помощью FACS-сортировки в препаративном масштабе. В некоторых вариантах осуществления клеточную популяцию, описанную здесь, собирают и обогащают (или обедняют) с использованием микроэлектромеханической системы (MEMS) в комбинации с системой детектирования на основе FACS (см. например, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; и Goodin et al. (2008) J Biophoton). В обоих случаях клетки могут быть помечены несколькими маркерами, давая возможность выделения необходимых подмножеств Т-клеток с высокой чистотой.

[0143] В некоторых вариантах осуществления антитела или партнеры связывания метят одним или несколькими детектируемыми маркерами, чтобы облегчить разделение для положительного и/или негативного отбора. Например, разделение может быть основано на связывании с флуоресцентно-меченными антителами. В некоторых примерах разделение клеток путем связывания с антителами или другими партнерами связывания, специфическими для одного или нескольких маркеров клеточной поверхности, проводят в жидкостном потоке, с использованием метода флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS), включая FACS в препаративном масштабе и/или с использованием микроэлектромеханической системы (MEMS), например, в сочетании с системой проточного цитометрической регистрации. Такие способы позволяют осуществлять одновременно положительный и негативный отбор на основе множества маркеров.

[0144] В некоторых вариантах осуществления выделение и/или отбор приводят к получению одной или нескольких композиций обогащенных Т-клеток, например, CD3+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления две или более отдельных композиций обогащенных Т-клеток выделяют, отбирают, обогащают или получают из одного биологического образца. В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции выделяют, отбирают, обогащают и/или получают из отдельных биологических образцов, собранных, взятых и/или полученных от одного субъекта.

[0145] В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделение и/или отбор приводят к получению одной или нескольких композиций обогащенных Т-клеток, которые содержат по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 65%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 98%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD3+ Т-клеток. В конкретном варианте осуществления изобретения композиция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD3+ Т-клеток.

[0146] В некоторых вариантах осуществления, выделение и/или обогащение приводит к получению композиций обогащенных CD4+ Т-клеток, которые содержат по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 65%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 98%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, входная композиция CD4+ Т-клеток содержит менее или приблизительно менее 40%, менее или приблизительно менее 35%, менее или приблизительно менее 30%, менее или приблизительно менее 25%, менее или приблизительно менее 20%, менее или приблизительно менее 15%, менее или приблизительно менее 10%, менее или приблизительно менее 5%, менее или приблизительно менее 1%, менее или приблизительно менее 0,1%, или менее или приблизительно менее 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клеток, и/или является свободной или по существу свободной от CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD4+ Т-клеток.

[0147] В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделение и/или обогащение приводит к получению композиций обогащенных CD8+ Т-клеток, которые содержат по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 65%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или

приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 98%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция CD8+ Т-клеток содержит менее или приблизительно менее 40%, менее или приблизительно менее 35%, менее или приблизительно менее 30%, менее или приблизительно менее 25%, менее или приблизительно менее 20%, менее или приблизительно менее 15%, менее или приблизительно менее 10%, менее или приблизительно менее 5%, менее или приблизительно менее 1%, менее или приблизительно менее 0,1%, или менее или приблизительно менее 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клеток, и/или является свободной или по существу свободной от CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD8+ Т-клеток.

[0148] В некоторых вариантах осуществления, после выделения, отбора и/или обогащения, одна или несколько композиций, обогащенных Т-клетками, заморожены, например, методом криоконсервирования и/или криогенным методом. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных CD4+ Т-клеток после выделения, отбора и/или обогащения замораживают, например, методом криоконсервирования и/или криогенным методом. В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию обогащенных CD8+ Т-клеток после выделения, селекции и/или обогащения замораживают, например, методом криоконсервирования и/или криогенным методом. В некоторых вариантах осуществления изобретения одну или несколько композиций обогащенных Т-клеток замораживают, например, методом криоконсервирования и/или криогенным методом, перед любыми стадиями инкубирования, активации, стимуляции, генно-инженерного конструирования, трансдукции, трансфекции, культивирования, размножения, сбора и/или приготовления композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения композицию обогащенных CD4+ Т-клеток замораживают, например, методом криоконсервирования и/или криогенным методом, перед любыми стадиями инкубирования, активации, стимуляции, генно-инженерного конструирования, трансдукции, трансфекции, культивирования, размножения, сбора и/или приготовления композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию обогащенных CD8+ Т-клеток замораживают, например, методом криоконсервирования и/или криогенным методом, перед любыми стадиями инкубирования, активации, стимуляции, генно-инженерного конструирования, трансдукции, трансфекции, культивирования, размножения, сбора и/или приготовления композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения одну или несколько входных замороженных композиций хранят, например, при температуре приблизительно -80°C в течение от 12 часов до 7 дней, от 24 часов до 120 часов, или от 2 до 5 дней. В

конкретных вариантах осуществления изобретения одну или несколько входных замороженных композиций хранят при температуре приблизительно -80°C в течение времени менее 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней или 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения одну или несколько входных замороженных композиций хранят при температуре приблизительно -80°C, например, в течение приблизительно 1 дня, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней или 6 дней.

[0149] В некоторых вариантах осуществления изобретения образцы, содержащие клетки (например, продукт афереза или продукт лейкафереза), промывают для удаления одного или нескольких антикоагулянтов, таких как гепарин, которые добавляют во время афереза или лейкаферза.

[0150] В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий клетки (например, образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), нефракционированный Т-клеточный образец, образец лимфоцитов, образец белых клеток крови, продукт афереза или продукт лейкафереза), является криоконсервированным и/или криозащищенным (например, замороженным) и затем оттаянным перед любыми стадиями выделения, отбора, активации, стимуляции, генно-инженерного конструирования, трансдукции, трансфекции, инкубирования, культивирования, сбора, приготовлении композиции популяции клеток и/или введения композиции популяции клеток субъекту.

[0151] В конкретных вариантах осуществления продукт афереза или продукт лейкафереза является криоконсервированным и/или криозащищенным (например, замороженным), а затем его оттаивают до стадии селекции или выделения клеток (например, стадии селекции или выделения Т-клеток), как описано ниже. В некоторых вариантах осуществления после того, как криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкафереза подвергают отбору или выделению Т-клеток, дополнительную стадию криоконсервирования и/или криозащиты не проводят во время или между любыми последующими стадиями, такими как стадии активации, стимуляции, генно-инженерного конструирования, трансдукции, трансфекции, инкубирования, культивирования, сбора, приготовлении композиции популяции клеток и/или введения композиции популяции клеток субъекту. Например, Т-клетки, отобранные из размороженного криоконсервированного и/или криоконсервированного продукта афереза или продукта лейкафереза, не подвергают криоконсервированию и/или криозащите перед оттаиванием для использования в последующих процессах, таких как активация/стимуляция или трансдукция Т-клеток.

[0152] В конкретных вариантах осуществления готовят криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкафереза (например, без Т-клеточного отбора перед замораживанием образца), который в некоторых аспектах может обеспечить большую гибкость для последующих стадий процесса. В одном аспекте, подготовка клеток до стадии отбора увеличивает выходы клеток на последующих стадиях процесса, и предварительно подготовленные клетки могут быть более полезными и они

могут более успешно использоваться для достижения заданных критериев. В другом аспекте, криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкафереза после оттаивания может быть подвергнут одному или нескольким различным способам селекции/отбора. Преимуществами этого подхода являются, среди прочего, повышение доступности, эффективности и/или других аспектов клеток клеточной терапии для лечения заболевания или состояния субъекта, такого как донора образца и/или другого реципиента.

[0153] В некоторых вариантах осуществления получают образец (например, образец афереза или лейкокафереза) и его подвергают криоконсервации и/или криозащите до или без предварительного отбора клеток (например, без предварительного отбора Т-клеток, такого как отбор с помощью хроматографии), в течение времени, необходимого для диагностики заболевания или состояния у донора. В некоторых аспектах время криоконсервирования также соответствует периоду времени, в течение которого как донор получил одно или несколько из следующего: любое первичное лечение заболевания или состояния, любое целевое лечение или любое другое лечение, направленное на лечение заболевания или состояния, или любое другое лечение, отличное от радиотерапии и/или химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления образец берут после первого рецидива заболевания после первичного лечения заболевания, и до того, как донор или субъект получает последующее лечение заболевания. Первичное и/или последующее лечения могут быть терапией, отличной от клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления собранные клетки можно использовать в клеточной терапии после первичного и/или последующего лечения. В одном аспекте использование криоконсервированного и/или криозащищенного образца, который не был подвергнут предварительному отбору клеток, может способствовать снижению предварительных расходов, связанных, например, с перерывом в лечении пациентов в рандомизированном клиническом исследовании, в отношении которых может потребоваться лечение в более позднем периоде.

[0154] В некоторых вариантах осуществления получают образец (например, образец афереза или лейкокафереза) и его подвергают криоконсервации и/или криозащите до или без предварительного отбора клеток (например, без предварительного отбора Т-клеток, такого как отбор с помощью хроматографии), в момент времени после второго рецидива заболевания после второй линии лечения заболевания, и до того, как донор или субъект получит последующее лечение заболевания. В некоторых вариантах осуществления пациентов идентифицируют как имеющих рецидив после второй линии лечения, например, путем оценки определенных факторов риска. В некоторых вариантах осуществления факторы риска основаны на типе заболевания и/или на генетических факторах, где заболеванием является лимфома с двойным поражением, первичный рефракторный рак или активированная В-клеточная лимфома. В некоторых вариантах осуществления факторы риска основаны на клиническом проявлении, таком как ранний

рецидив после первой линии лечения, или на других прогностических индикаторах после проведения лечения (например, когда IPI (международный прогностический индекс) > 2).

[0155] В некоторых вариантах осуществления получают образец (например, образец афереза или лейкокафереза) и его подвергают криоконсервации и/или криозащите до или без предварительного отбора клеток (например, без предварительного отбора Т-клеток, такого как отбор с помощью хроматографии), в момент времени до того, как у донора или субъекта диагностировано заболевание. В некоторых аспектах донор или субъект может быть определен как донор или субъект имеющий риск развития заболевания. В некоторых аспектах донор или субъект может быть здоровым субъектом. В некоторых случаях клетки могут быть взяты у донора или субъекта без риска развития заболевания или при диагностике заболевания, и они могут быть сохранены в случае, когда на более поздней стадии жизни может потребоваться клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления донор или субъект может считаться как субъект с риском развития заболевания на основе таких факторов, как генетические мутации, генетические нарушения, генетические нарушения, семейный анамнез, белковые нарушения (такие как недостаток продукции и/или процессинга белка) и образ жизни, которые могут повышать риск развития заболевания. В некоторых вариантах осуществления клетки собирают для возможного использования в будущем.

[0156] В некоторых вариантах осуществления получают образец (например, образец афереза или лейкокафереза) и его подвергают криоконсервации и/или криозащите до или без предварительного отбора клеток (например, без предварительного отбора Т-клеток, такого как отбор с помощью хроматографии), хранят в течение периода времени, превышающего или равного по меньшей мере приблизительно 12 часов, 24 часа, 36 часов или 48 часов. В некоторых вариантах осуществления образец хранят в течение периода времени, превышающего или равного 1 неделе, 2 неделям, 3 неделям или 4 неделям. В некоторых вариантах осуществления образец помещают на долгосрочное хранение или помещают в банк для образцов. В некоторых аспектах образец хранят в течение периода времени, превышающего или по меньшей мере равного приблизительно 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года, 4 года, 5 лет, 6 лет, 7 лет8 лет, 9 лет, 10 лет, 1 года, 12 лет, 13 лет, 14 лет, 15 лет, 16 лет, 17 лет, 18 лет, 19 лет, 20 лет, 25 лет, 30 лет, 35 лет, 40 лет или более.

[0157] В некоторых вариантах осуществления образец афереза или лейкокафереза, взятый у донора, переносят для транспортировки в охлажденную среду в устройство для хранения или в устройство для обработки, и/или криогенно хранят в средстве хранения или обрабатывают в устройстве для обработки. В некоторых вариантах осуществления образец перед транспортировкой подвергают обработке, например, путем отбора Т-клеток, таких как CD4+ и/или CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления такую обработку выполняют после транспортировки и перед криогенным хранением

образца. В некоторых вариантах осуществления обработку проводят после оттаивания образца после хранения в замороженном состоянии.

[0158] За счет хранения клеток, полученных от доноров на стадии, когда доноры не получали лечение, и, следовательно, их клетки не подверглись воздействию за счет такого лечения заболевания и/или до возникновения заболевания или состояния или его диагностики, такие клетки могут иметь определенные преимущества для использования в клеточной терапии, по сравнению с клетками, полученными от донора после одного или нескольких циклов лечения. Например, клетки, полученные от донора до одного или нескольких циклов лечения, могут быть более полезными, и они могут проявлять более высокие уровни некоторых клеточных активностей, могут расти быстрее и/или могут быть более восприимчивыми к генетическим манипуляциям, чем клетки, после нескольких циклов лечения. Другой пример преимущества согласно вариантам осуществления, описанным здесь, может включать удобство обращения с клетками. Например, при проведении отбора клеток у донора, необязательной обработки и хранения клеток до момента, когда они будут необходимы для клеточной терапии, клетки будут легко доступны в момент времени, когда получатель будет нуждаться в них. Это может разгрузить работу лаборатории по аферезу и предоставить специалистам большую гибкостью в планировании процесса сбора образцов афереза.

[0159] Примеры способов и систем для криогенного хранения и обработки клеток образца, такого как образец афереза, могут включать те, которые описаны в международной опубликованной заявке WO 2018/170188. В некоторых вариантах осуществления способ и системы включают сбор образцов афереза до того моментаЮ, когда пациент будет нуждаться в клеточной терапии, и затем образцы афереза подвергают криоконсервации для последующего использования в процессе конструирования клеток, например Т-клеток, с использованием рекомбинантного рецептора (например, CAR). В некоторых случаях такие способы могут включать способы, которые описаны в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления образец афереза берут у субъекта, и криоконсервирование проводят перед отбором Т-клеток, активации, стимуляции, генно-инженерного конструирования, трансдукции, трансфекции, инкубирования, культивирования и сбора клеток, приготовление композиции из популяции клеток и/или введения композиции популяции клеток субъекту. В таких примерах криоконсервированный образец афереза оттаивают перед проведением одной или нескольких стадий отбора, из числа тех, которые описаны в настоящей заявке.

[0160] В некоторых вариантах осуществления криоконсервированный и/или криоконзащищенный образец клеток (например, образей афереза или лейкокафереза), такой как образец клеток, который не был подвергнут предварительному отбору клеток (например, без предварительного отбора Т-клеток, такого как селекция с помощью хроматографии), оттаивают перед его использованием в последующих процессах получения клеточной популяции для клеточной терапии, например Т-клеточной популяции, содержащей CAR+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления такой

криоконсервированный и/или криозащищенный образец клеток (например, образец афереза или лейкафереза) используют в рамках описанного здесь способа терапии с использованием сконструированных Т-клеток, такого как CAR+ Т-клеточная терапия. В отдельных примерах не выполняют никакой дополнительной стадии криоконсервации до или во время стадий сбора клеток/приготовления композиции.

I. Входные композиции

[0161] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы используют при получении и/или приготовления входной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления входная композиция клеток представляет собой композицию клеток для использования в генной инженерии, например, клеток, которые будут генетически сконструированы и/или которые будут подвергаться процессу получения генетически сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки обрабатывают, приводят в контакт и/или инкубируют с нуклеиновой кислотой, которая кодирует рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления содержит CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения входная композиция клеток содержит CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, которые являются наивными Т-клетками и/или Т-клетками, подобными наивным.

[0162] В некоторых вариантах осуществления желаемое, заданное и/или контролируемое соотношение представляет собой соотношение или количество клеток, в которых два типа клеток или выделенных клеточных популяций включены во входную композицию клеток, сконструированную таким образом, чтобы получить выходную композицию клеток с желаемым, заданным и/или регулируемым соотношением сконструированных CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, или в пределах допустимого уровня ошибок или допустимого различия по завершении и/или в ходе стадий инкубирования и/или генно-инженерного конструирования или других стадий обработки, и/или непосредственно перед введением субъекту.

[0163] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения входная композиция представляет собой композицию обогащенных CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, входная композиция состоит из или содержит по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 65%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 98%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения входная композиция состоит по существу из CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах

осуществления настоящего изобретения входная композиция представляет собой композицию клеток обогащенных CD4+ Т-клетками и CD8+ Т-клетками. В конкретных вариантах осуществления входная композиция состоит из или содержит по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 65%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 98%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% клеток, которые представляют собой CD4+ или CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция состоит по существу из CD4+ и CD8+ Т-клеток.

[0164] В конкретных вариантах осуществления изобретения входная композиция содержит от по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 30% и до по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, от по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 35% до по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 65%, от по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 40% до по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, или от по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 45% до по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 55%, или приблизительно 50% или 50% CD4+ Т-клеток, и от по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 30% и до по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, от по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 35% до по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 65%, от по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 40% до по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, или от по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 45% до по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 55%, или приблизительно 50% или 50% CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения входная композиция содержит от по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 45% до по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 55%, приблизительно 50% или 50% CD4+ Т-клеток и от по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 45% до по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 55%, приблизительно 50% или 50% CD8+ Т-клеток.

[0165] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну отдельную композицию обогащенных CD4+ Т-клеток и по меньшей мере одну отдельную композицию обогащенных CD8+ Т-клеток выделяют, отбирают, обогащают или получают из одного биологического образца, например, образца PBMC или других белых кровяных клеток от одного донора, такого как пациент или здоровый индивидуум. В некоторых

вариантах осуществления отдельная композиция обогащенных CD4+ Т-клеток и отдельная композиция обогащенных CD8+ Т-клеток происходит, т.е. выделена, отобрана и/или обогащена, из одного биологического образца, такого как один биологический образец, полученный и/или взятый у одного субъекта. В некоторых вариантах осуществления биологический образец сначала подвергают отбору CD4+ Т-клеток, сохраняя как негативные, так и положительные фракции, и негативную фракцию дополнительно подвергают селекции по CD8+ Т-клеткам. В других вариантах осуществления биологический образец сначала подвергают селекции по CD8+ Т-клеткам, сохраняя как негативные, так и положительные фракции, и негативную фракцию дополнительно подвергают селекции по CD4+ Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления способы селекции/отбора проводят, как описано в международной публикации заявки PCT WO 2015/164675. В некоторых аспектах биологический образец сначала подвергают положительному отбору по CD8+ Т-клеткам для получения по меньшей мере одной композиции обогащенных CD8+ Т-клеток, и затем негативную фракцию подвергают положительному отбору по CD4+ Т-клеткам, с получением по меньшей мере одной композиции обогащенных CD4+ Т-клеток, так что по меньшей мере одна композиция обогащенных CD8+ Т-клеток и по меньшей мере одна композиция обогащенных CD4+ Т-клеток являются отдельными композициями, полученными из одного и того же биологического образца, например, от одного и того же донора или здорового индивидуума. В некоторых аспектах две или более отдельных композиций обогащенных Т-клеток, например по меньшей мере одна, представляет собой композицию обогащенных CD4+ Т-клеток, и по меньшей мере одна композиция представляет собой отдельную композицию обогащенных CD8+ Т-клеток от одного донора, и эти композиции по-отдельности замораживают, например, путем криозамораживания или криоконсервации в среде для криоконсервирования. В некоторых аспектах криоконсервированные клеточные композиции отдельно хранят и/или перевозят в отдельных контейнерах для одной или более загрузок. В некоторых аспектах отдельно замороженные композиции клеток оттаивают и необязательно промывают.

[0166] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну отдельную композицию обогащенных CD4+ Т-клеток и по меньшей мере одну отдельную композицию обогащенных CD8+ Т-клеток выделяют, отбирают, обогащают или получают из одного биологического образца, оттаивают и смешивают, объединяют и/или комбинируют, и композиции могут быть необязательно подвергнуты промывке до или после смешивания, объединения и/или комбинирования. В некоторых аспектах смешанные, объединенные и/или комбинированные и необязательно промытые композиции обогащенных Т-клеток образуют входную композицию. В некоторых аспектах входную композицию (например, содержащую CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки в соотношении равном или приблизительно равном 1:1) активируют и/или стимулируют путем контактирования со стимулирующим реагентом (например, путем инкубирования с конъюгированными с CD3/CD28 магнитными шариками для активации Т-клеток), и объем

композиции клеток, полученной после активации/стимуляции необязательно регулируют, например, с целью достижения целевого объема. В некоторых аспектах активированную/стимулированную композицию клеток генетически конструируют, трансдуцируют и/или трансфицируют, используя, например, ретровирусный вектор, кодирующий рекомбинантный белок (например, CAR) для экспрессии этого рекомбинантного белка в CD4+ Т-клетках и CD8+ Т-клетках композиции клеток. В некоторых аспектах объем композиции клеток по изобретению необязательно регулируют, например, для достижения целевого объема. В некоторых аспектах способ включает удаление реагента стимулирования, например магнитных шариков, из композиции клеток. В некоторых аспектах композицию клеток, содержащую сконструированные CD4+ Т-клетки и сконструированные CD8+ Т-клетки, культивируют, например, для размножения популяции CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композицию клеток после культивирования собирают и/или выделяют и/или готовят конечную композицию, например, путем промывки композиции клеток в буфере для приготовления конечной композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения конечную композицию клеток, содержащую CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, замораживают, например, криогенным способом или способом криоконсервирования в среде для криоконсервирования. В некоторых аспектах криоконсервированная композиция может храниться и/или транспортироваться в одном или нескольких контейнерах. В некоторых аспектах сконструированные CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки в композиции происходят от одного донора или биологического образца и экспрессируют один и тот же рекомбинантный белок (например, CAR), и такую композицию вводят субъекту, нуждающемуся в таком лечении, который является донором клеток.

[0167] В конкретных вариантах осуществления изобретения входная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, равное от 3:1 до 1:3, от 2:1 до 1:2, от 1,5 до 0,75, от 1,25 до 0,75 или от 1,2 до 0,8. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения входная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток равное 1:1.

[0168] В некоторых вариантах осуществления клетки из композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и клетки из композиции обогащенных CD8+ Т-клеток смешивают, объединяют и/или комбинируют для получения входной композиции, содержащей CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток смешивают, объединяют и/или комбинируют перед инкубированием клеток в условиях стимуляции. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток смешивают, объединяют и/или комбинируют после выделения, обогащения и/или отбора CD4+ и CD8+ Т-клеток из биологического образца. В конкретных вариантах осуществления изобретения композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток смешивают, объединяют и/или комбинируют после замораживания, например,

криогенного замораживания и оттаивания композиций обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток.

[0169] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения входную композицию получают, изготавливают или образуют путем смешивания, объединения и/или комбинирования клеток из композиции обогащенных CD4+ клеток с клетками из композиции обогащенных CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция обогащенных CD4+ Т-клеток содержит по меньшей мере приблизительно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения композиция обогащенных CD4+ Т-клеток содержит 100% CD4+ Т-клеток или содержит приблизительно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция обогащенных Т-клеток содержит менее или приблизительно менее 20%, менее или приблизительно менее 10%, менее или приблизительно менее 5%, менее или приблизительно менее 1%, менее или приблизительно менее 0,1%, или менее или приблизительно менее 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клеток, и/или является свободной или по существу свободной от CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток состоят по существу из CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция обогащенных CD8+ Т-клеток содержит по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% CD8+ Т-клеток, или содержит 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток содержит менее или приблизительно менее 20%, менее или приблизительно менее 10%, менее или приблизительно менее 5%, менее или приблизительно менее 1%, менее или приблизительно менее 0,1%, или менее или приблизительно менее 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клеток, и/или является свободной или по существу свободной от CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток состоят по существу из CD8+ Т-клеток.

[0170] В некоторых вариантах осуществления изобретения, CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки смешивают, объединяют и/или комбинируют при соотношении CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 1:10 до 10:1, от 1:5 до 5:1, от 4:1 до 1:4, от 3:1, от 1:3 до 3:1, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,25:1 до 1:1,25, от 1,2:1 до 1:1,2, от 1,1:1 до 1:1,1, или в соотношении 1:1 или приблизительно 1:1. В конкретных вариантах осуществления CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки смешивают, объединяют и/или комбинируют при соотношении CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,25:1 до 1:1,25, от 1,2:1 до 1:1,2, от 1,1:1 до 1:1,1 или в соотношении 1:1 или приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки смешивают, объединяют и/или комбинируют при соотношении CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток приблизительно равном 1:1.

[0171] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки из композиций, обогащенных CD4+ Т-клеток и композиции обогащенных CD8+ Т-клеток смешивают,

объединяют и/или комбинируют при соотношении CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 1:10 до 10:1, от 1:5 до 5:1, от 4:1 до 1:4, от 3:1, от 1:3 до 3:1, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,25:1 до 1:1,25, от 1,2:1 до 1:1,2, от 1,1:1 до 1:1,1, или в соотношении 1:1 или приблизительно 1:1. В конкретных вариантах осуществления клетки композиций, обогащенных CD4+ Т-клетками и CD8+ Т-клетками смешивают, объединяют и/или комбинируют при соотношении CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,25:1 до 1:1,25, от 1,2:1 до 1:1,2, от 1,1:1 до 1:1,1 или в соотношении 1:1 или приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления клетки композиций, обогащенных CD4+ Т-клетками и CD8+ Т-клетками смешивают, объединяют и/или комбинируют при соотношении CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток приблизительно равном 1:1.

[0172] В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция имеет определенное соотношение, например, заданное, контролируемое и/или фиксированное соотношение, CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным». В конкретных вариантах осуществления изобретения соотношение CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», составляет от 10:1 до 0,05:1, от 8:1 до 0,1:1, от 5:1 до 0,2:1, от 2,5:1 до 0,25:1, от 2,2:1 до 0,8:1, от 2:1 до 0,5:1 или от 1,5:1 до 1:1 включительно. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения соотношение CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», составляет от 2:1 до 0,8:1, от 1,6:1 до 0,8:1, от 1,4:1 до 0,8:1, от 1,2:1 до 0,8:1 или от 1,2:1 до 0,8:1 включительно. В некоторых вариантах осуществления это соотношение составляет от 2,2:1 до 0,8:1 включительно. В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», равно или приблизительно равно 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 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, 1,0:1, 0,9:1 или 0,8:1. В некоторых вариантах осуществления это соотношение равно или приблизительно равно 1,1:1.

[0173] В конкретных вариантах осуществления изобретения входная композиция содержит общее количество клеток или общее количество жизнеспособных клеток равное или приблизительно равное 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1{,}0 \times 10^8$, $1{,}1 \times 10^8$, $1{,}2 \times 10^8$, $1{,}3 \times 10^8$, $1{,}4 \times 10^8$, $1{,}5 \times 10^8$, $1{,}6 \times 10^8$, $1{,}7 \times 10^8$, $1{,}8 \times 10^8$, $1{,}9 \times 10^8$, $2{,}0 \times 10^8$, $2{,}1 \times 10^8$, $2{,}2 \times 10^8$, $2{,}3 \times 10^8$, $2{,}4 \times 10^8$, $2{,}5 \times 10^8$, $2{,}6 \times 10^8$, $2{,}7 \times 10^8$, $2{,}8 \times 10^8$, $2{,}9 \times 10^8$, $3{,}0 \times 10^8$, $3{,}5 \times 10^8$, $4{,}0 \times 10^8$, $4{,}5 \times 10^8$, 5×10^8, 5×10^8 или 1×10^9. В некоторых вариантах осуществления входная композиция содержит клетки, экспрессирующие CD4 или CD8, в количестве, равном 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1{,}0 \times 10^8$, $1{,}1 \times 10^8$, $1{,}2 \times 10^8$, $1{,}3 \times 10^8$, $1{,}4 \times 10^8$, $1{,}5 \times 10^8$, $1{,}6 \times 10^8$, $1{,}7 \times 10^8$, $1{,}8 \times 10^8$, $1{,}9 \times 10^8$, $2{,}0 \times 10^8$, $2{,}1 \times 10^8$, $2{,}2 \times 10^8$, $2{,}3 \times 10^8$, $2{,}4 \times 10^8$, $2{,}5 \times 10^8$, $2{,}6 \times 10^8$, $2{,}7 \times 10^8$, $2{,}8 \times 10^8$, $2{,}9 \times 10^8$, $3{,}0 \times 10^8$, $3{,}5 \times 10^8$, $4{,}0 \times 10^8$, $4{,}5 \times 10^8$, 5×10^8, 5×10^8 или 1×10^9. В некоторых вариантах осуществления входная композиция содержит CD4+ Т-клетки, подобные «наивным», и CD8+ Т-клетки, подобные «наивным», в количестве, равном 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1{,}0 \times 10^8$, $1{,}1 \times 10^8$, $1{,}2 \times 10^8$, $1{,}3 \times$

10^8, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8, 5×10^8 или 1×10^9.

[0174] В конкретных вариантах осуществления изобретения входная композиция содержит общее количество клеток или общее количество жизнеспособных клеток от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 1×10^{10}, от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до 1×10^9, от или приблизительно от 5×10^7 до или приблизительно до 5×10^8, от или приблизительно от 1×10^8 до или приблизительно до 3×10^8. В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция содержит клетки, экспрессирующие CD4 или CD8, в количестве от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 1×10^{10}, от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до 1×10^9, от или приблизительно от 5×10^7 до или приблизительно до 5×10^8, от или приблизительно от 1×10^8 до или приблизительно до 3×10^8 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция содержит CD4+ Т-клетки, подобные «наивным», и CD8+ Т-клетки, подобные «наивным», в количестве от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 1×10^{10}, от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до 1×10^9, от или приблизительно от 5×10^7 до или приблизительно до 5×10^8, от или приблизительно от 1×10^8 до или приблизительно до 3×10^8 клеток.

[0175] В некоторых вариантах осуществления входная композиция имеет или содержит клетки, подобные «наивным», в количестве по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 10%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 20%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 30%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 40%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 96%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 97%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 98%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,9%, или 100% или приблизительно 100%. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения входная композиция содержит или включает не более или приблизительно не более 100%, не более или приблизительно не более 99%, не более или приблизительно не более 98%, не более или приблизительно не более 97%, не более или приблизительно не более 96%, не более или приблизительно не более 95%, не

более или приблизительно не более 90% или не более или приблизительно не более 85% клеток, подобных «наивным» клеткам.

[0176] В конкретных вариантах осуществления способы, представленные здесь, включают одну или несколько стадий получения, образования и/или изготовления входной композиции. В некоторых вариантах осуществления получение, образование и/или изготовление входной композиции включает одну или несколько стадий смешивания или комбинирования клеток композиции CD4+ Т-клеток с клетками композиции CD8+ Т-клеток.

[0177] В некоторых вариантах осуществления клетки, например CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, выделены и/или отобраны из образца, например биологического образца. В некоторых вариантах осуществления источником клеток входной композиции являются композиции клеток, например композиции CD4+ и CD8+ Т-клеток, которые выделены и/или отобраны из образца. В конкретных вариантах осуществления изобретения композицию CD4+ Т-клеток и композицию CD8+ Т-клеток выделяют и/или отбирают из образца, например биологического образца. В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию CD4+ Т-клеток и композицию CD8+ Т-клеток выделяют и/или отбирают из одного и того же образца. В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию CD4+ Т-клеток и композицию CD8+ Т-клеток выделяют и/или отбирают из образцов, взятых или полученных от одного и того же субъекта.

[0178] В конкретных вариантах осуществления изобретения, композиция CD4+ Т-клеток содержит или включает по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 96%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 97%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 98%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,9%, или 100% или приблизительно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция CD4+ Т-клеток содержит или включает не более или приблизительно не более 100%, не более или приблизительно не более 99%, не более или приблизительно не более 98%, не более или приблизительно не более 97%, не более или приблизительно не более 96%, не более или приблизительно не более 95%, не более или приблизительно не более 90% или не более или приблизительно не более 85% CD4+ Т-клеток.

[0179] В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция CD8+ Т-клеток содержит или включает по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей

мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 96%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 97%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 98%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,9%, или 100% или приблизительно 100% CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция CD8+ Т-клеток содержит или включает не более или приблизительно не более 100%, не более или приблизительно не более 99%, не более или приблизительно не более 98%, не более или приблизительно не более 97%, не более или приблизительно не более 96%, не более или приблизительно не более 95%, не более или приблизительно не более 90% или не более или приблизительно не более 85% CD8+ Т-клеток.

[0180] В некоторых вариантах осуществления получение, образование и/или изготовление входной композиции включает одну или несколько стадий измерения, определения и/или количественной оценки количества, части, количества в объеме, количества по массе и/или процентной доли жизнеспособных CD4+ Т-клеток и/или жизнеспособных CD8+ Т-клеток, которые присутствуют в композиции CD4+ Т-клеток и/или композиции CD8+ Т-клеток, например, до объединения или смешивания клеток клеточных композиций. В конкретных вариантах осуществления способ получения, образования и/или изготовления входной композиции включает одну или несколько стадий измерения, определения и/или количественной оценки количества, части, количества в объеме, количества по массе и/или процентной доли CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и/или CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», которые присутствуют в композиции CD4+ Т-клеток и/или в композиции CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетки, подобные «наивным», и/или CD8+ Т-клетки, подобные «наивным», представляют собой жизнеспособные клетки, подобные «наивным» клеткам.

[0181] В некоторых вариантах получение, образование и/или изготовление входной композиции включает одну или несколько стадий измерения, определения и/или количественной оценки количества, части, количества в объеме, количества по массе и/или процентной доли жизнеспособных CD4+ Т-клеток и/или жизнеспособных CD8+ Т-клеток, которые присутствуют в образце, например, в биологическом образце. В конкретных вариантах осуществления способ получения, образования и/или изготовления входной композиции включает одну или несколько стадий измерения, определения и/или количественной оценки количества, части, количества в объеме, количества по массе и/или процентной доли CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и/или CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», которые присутствуют в образце. В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетки, подобные «наивным», и/или CD8+ Т-клетки, подобные «наивным», представляют собой жизнеспособные клетки, подобные «наивным» клеткам.

[0182] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки входной композиции выделяют и/или отбирают из образца, например биологического образца. В конкретных вариантах осуществления изобретения доля клеток, подобных «наивным», например доля CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», известна или определена, измерена или оценена. В некоторых вариантах осуществления клетки из образца выделяют и/или отбирают для непосредственного получения композиции клеток, например, выходной композиции, с заданным, регулируемым и/или фиксированным соотношением CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным». В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки выделяют и/или отбирают с использованием иммуноаффинного метода на шариках. В некоторых вариантах осуществления клетки выделяют и/или отбирают с помощью аффинных колонок. В конкретных вариантах осуществления клетки из образца выделяют или отбирают в соответствии с любым из способов, описанных в WO 2015/164675, получая композицию клеток с заданным, регулируемым и/или фиксированным соотношением CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным».

[0183] В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция содержит клетки, которые были непосредственно выделены и/или отобраны из образца первым и вторым выделением или отбором. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения входную композицию получают путем осуществления первого и второго отбора для выделения количества или концентрации CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, достаточных для получения заданного, фиксированного и/или регулируемого соотношения CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным».

[0184] В некоторых вариантах осуществления клетки из образца непосредственно выделяют, отбирают и/или обогащают для получения входной композиции, обогащенной CD4+ клетками и CD8+ клетками. В некоторых вариантах осуществления количество, часть, количество на единицу объема, количество по массе и/или процентную долю CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», измеряют, оценивают и/или определяют в образце, и CD4+ и CD8+ клетки выделяют, отбирают и/или обогащают в количествах, достаточных для получения входной композиции с определенным, фиксированным или регулируемым соотношением CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным». В некоторых вариантах осуществления клетки, которые непосредственно выделяют, отбирают и/или обогащают из образца, представляют собой входную композицию и они используются на последующих стадиях обработки, таких как последующие стадии обработки, включающие инкубирование, стимуляцию, активацию, генно-инженерное конструирование и/или приготовление конечной композиции обогащенных клеток.

[0185] В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделенные, отобранные и/или обогащенные клетки из образца, представляющие собой входную

композицию, имеют соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеткам при определенном, фиксированном или регулируемом соотношении CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным». В вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, первый и/или второй отбор клеток или отбор субпопуляций клеток могут быть выполнены таким образом, чтобы получить входную композицию с желаемым соотношением CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным».

[0186] В некоторых вариантах выполнения изобретения, перед осуществлением первого и/или второго отбора из образца, определяют соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток в образце, например, в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления перед выполнением первого и/или второго отбора определяют соотношение CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным». На основе конкретного соотношения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток и/или соотношения CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», которые могут варьировать в образцах, конкретный способ селекции может быть индивидуализирован для конкретного образца, например, путем калибровки хроматографических колонок или выбора количества или концентрации иммуноаффинных реагентов для достижения желаемого, фиксированного или контролируемого соотношения. Относительный уровень или доля различных клеточных популяций у субъекта может быть определена на основании оценки поверхностной экспрессии маркера или маркеров, присутствующих на клетках таких популяций или субпопуляций. Можно использовать ряд хорошо известных способов оценки уровня экспрессии поверхностных маркеров или белков, таких как обнаружение методами аффинной хроматографии, например, иммуноаффинными методами, например, для определения белков клеточной поверхности, в частности, с использованием проточной цитометрии.

[0187] В некоторых вариантах подходящее соотношение CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным» может варьировать в зависимости от контекста, например, оно может варьироваться для конкретного заболевания, состояния субъекта или состояния субъекта до лечения, когда клетки получают от этого субъекта, и/или конкретной антиген-специфичности клеток в субпопуляции клеток конкретного типа (например, CD4+ клеток) и различных субпопуляций клеток, например, эффекторных клеток по отношению клеток памяти и по отношению «наивных» клеток, и/или одного или нескольких условий, при которых клетки будут инкубироваться, такими как среда, агенты для стимулирования, время культивирования, буферы, содержание диоксида углерода, содержание кислорода, антигены, цитокины, антитела и другие компоненты. Таким образом, может быть, что тип клеток, в отношении которого известно, что они обычно пролиферирует или размножаются быстрее, чем другие, не всегда будет обладать этим свойством в каждом контексте выполнения изобретения. Таким образом, в некоторых аспектах соотношение CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-

клеток, подобных «наивным», определяют на основании известных свойств типов клеток в нормальном или обычном контексте, связанного с оценкой фенотипов или состояний клеток или субъекта, от которого получены клетки, и/или эмпирических данных.

[0188] В некоторых вариантах осуществления отделение и/или стадии разделения проводят с использованием иммуномагнитных шариков. В некоторых вариантах осуществления образец клеток,, содержащий CD4+ и CD8+ клетки, приводят в контакт с магнитными шариками, содержащими первый иммуноаффинный реагент, который связывается с CD4 или CD8, и магнитными шариками, содержащими второй иммуноаффинный реагент, который связывается с другим из CD4 или CD8. Отделение и/или стадии разделения могут проводиться одновременно и/или последовательно.

[0189] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй иммуноаффинный реагент присутствуют в инкубируемой композиции при субоптимальной выходной концентрации, при этом обогащенная композиция содержит менее чем, например 70% CD4+ клеток от всех клеток в инкубируемой композиции и/или менее чем, например 70% CD8+ клеток от всех клеток в инкубируемой композиции, получая таким образом композицию, обогащенную CD4+ и CD8+ Т-клетками.

[0190] В некоторых вариантах осуществления изобретения субоптимальная выходная концентрация аффинного реагента представляет собой концентрацию, которая ниже используемой концентрации или которая требуется для достижения оптимального или максимального выхода связанных клеток в данном отборе или обогащении, включая инкубирование клеток с реагентом и выделение или отделение клеток, связанных с реагентом («выход», например, обозначает количество клеток, полученных или отобранных в таком процессе, по сравнению с общим количеством клеток при инкубировании, которые являются мишенью для реагента или в отношении которых реагент является специфическим, или которые имеют маркер, в отношении которого реагент является специфическим и способным к связыванию). Оптимальная концентрация выхода, как правило, представляет собой концентрацию или количество реагента, который в таком процессе или стадии обеспечивает выход не более 70% связанных клеток, например,, CD4+ и/или CD8+ Т-клеток по отношению всех клеток, связанных с реагентом, которые извлекаются после инкубирования. В некоторых вариантах осуществления выход, составляющий не более или приблизительно не более 50%, 45%, 40%, 30% или 25%, достигается с помощью оптимальной концентрации аффинного реагента. Концентрация может быть выражена в единицах количества или массы частиц или поверхности на клетку и/или количества массы или молекул агента (например, антитела, такого как фрагмент антитела) на клетку. В конкретных вариантах осуществления изобретения, субоптимальные выходные концентрации достаточны для получения или достижения фиксированного, регулируемого и/или определенного отношения CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным».

[0191] В некоторых вариантах осуществления, например, при работе при оптимальной концентрации выхода для каждого или нескольких из двух или более реагентов отбора с аффинностью к CD4+ Т-клеткам и/или CD8+ Т-клеткам, один или несколько таких реагентов используют в концентрации, которая выше, чем у одного или нескольких других таких реагентов, чтобы смещать соотношение типа клеток, распознаваемого этим реагентом, по сравнению с типом (типами) клеток, распознаваемого другим реагентом (реагентами). Например, реагент, специфически связывающийся с маркером, для которого желательно сместить соотношение, может быть введен в концентрации (например, количество или масса агента на клетку), которая увеличена наполовину, 1-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно, 10-кратно или более по сравнению с другим агентом (агентами), в зависимости от того, сколько его необходимо для увеличения соотношения.

[0192] В некоторых вариантах осуществления при работе с клетками в оптимальном и/или достаточном интервале, обеспечивающим достижение насыщение реагентов, количество иммуноаффинного реагента пропорционально ожидаемому выходу обогащенных клеток. В некоторых вариантах осуществления подходящее количество или концентрация иммуноаффинных реагентов, которые зависят от требуемого соотношения клеток в получаемой композиции, содержащей обогащенные или отобранные CD4+ и CD8+ Т-клетки, могут быть определены рутинными методами.

[0193] В некоторых вариантах стадии разделения и/или выделения проводят с использованием магнитных шариков, с которыми обратимо связаны иммуноаффинные реагенты, например, посредством взаимодействия пептидного лиганда с мутеином стрептавидина, как описано в WO 2015/164675. Прмером таких магнитных шариков являются шарики Streptaps®. В некоторых вариантах осуществления стадии разделения и/или выделения проводят с использованием магнитных шариков, таких как коммерчески доступные шарики от Miltenyi Biotec.

[0194] В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый отбор или обогащение CD4+ и CD8+ клеток из образца осуществляют с использованием реагентов для иммуноаффинной хроматографии, которые включают по меньшей мере первую и вторую аффинную хроматографическую матрицу, соответственно, с иммобилизованными на них антителом. В некоторых вариантах осуществления в первом и/или втором отборе можно использовать множество матриц и/или антител для аффинной хроматографии, и при этом множество матриц и/или антител, используемых для одного и того же отбора, т.е. первого отбора или второго отбора, последовательно соединены. В некоторых вариантах матрица для аффинной хроматографии или матрицы, применяемые в первом и/или втором отборе, адсорбируют или способны отделять или обогащать по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 50×10^6 клеток/мл, 100×10^6 клеток/мл, 200×10^6 клеток/мл или 400×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления адсорбционная емкость может модулироваться за счет диаметра и/или длины колонки. В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение в начале культивирования

отобранной или обогащенной композиции достигается путем выбора достаточного количества и/или относительного количества матрицы, исходя, например, из адсорбционной емкости или способности колонки или колонок, используемых при отборе клеток.

[0195] В одном варианте осуществления изобретения, CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки имеют равную или сходную долю CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», и адсорбционная способность матрицы или матриц является одинаковой для первого и второго отбора, например, она равна или составляет приблизительно 1×10^{10} клеток/мл для обоих, посредством чего обогащение или отбор клеток в первом отборе и во втором отборе приводит к получению композиции, содержащей CD4+ клетки и CD8+ клетки с соотношением CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», равным или приблизительно равным 1:1. В конкретных вариантах осуществления соответствующий объем, диаметр или количество хроматографических колонок с аффинной матрицей для первого и/или второго отбора в зависимости от соотношения клеток, подобных «наивным», и желательного соотношения в получаемой входной композиции может быть выбрано или определено рутинными методами.

[0196] В некоторых вариантах адсорбционная емкость матрицы или матриц в колонке или колонках регулируют с учетом различий в содержании клеток, подобных «наивным», например, CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», по сравнению с содержанием клеток CD4+ или CD8+ в исходной популяции в исходном образце, полученном от субъекта. Относительный уровень или содержание различных клеточных популяций у субъекта могут быть определены на основании оценки поверхностной экспрессии маркера или маркеров, присутствующих на клетках таких популяций или субпопуляций. Можно использовать ряд хорошо известных способов оценки уровня экспрессии поверхностных маркеров или белков, таких как обнаружение методами аффинной хроматографии, например методами иммуноаффинной хроматографии, в частности, в отношении белков клеточной поверхности, с использованием, например, проточной цитометрии.

[0197] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, подобных «наивным», например, CD4+ Т-клетки, подобные «наивным», и CD8+ Т-клетки, подобные «наивным», определяют, измеряют и/или детектируют в композициях клеток, например, в композициях CD4+ и/или CD8+ Т-клеток, или в образце, например, в биологическом образце. В некоторых вариантах Т-клетка, подобная «наивной», представляет собой Т-клетку, которая является положительной по экспрессии одного или нескольких маркеров, которые указывают на то, что клетка является «наивной» клеткой или клеткой, подобной «наивной». В некоторых вариантах Т-клетка, подобная «наивной», представляет собой клетку, которая является положительной по экспрессии маркера, ассоциированного с «наивным» состоянием клетки или с состоянием клетки, которое определено как "подобная «наивной»". В некоторых вариантах Т-клетка, подобная

«наивной», представляет собой клетку, которая не экспрессирует маркер, ассоциированный с «не-наивным» состоянием клетки или с состоянием клетки, подобном «не-наивном». В некоторых вариантах Т-клетки, которые являются клетками в «не-наивном» состоянии или в состоянии, подобном «не-наивном», включает, например, но без ограничения, эффекторные Т-клетки (T_{EFF}), Т-клетки памяти, Т-клетки центральной памяти (T_{CM}), Т-клетки эффекторной памяти (T_{EM}) и их комбинации.

[0198] В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетка, подобная «наивной», является положительной по экспрессии по меньшей мере одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более десяти маркеров, которые указывают на то, что клетка является «наивной» и/или подобной «наивной», и/или ассоциируется с «не-наивным» состоянием или с состоянием подобном «не-наивным». В некоторых вариантах маркеры экспрессируются на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка, подобная «наивной», является негативной по экспрессии по меньшей мере одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более десяти маркеров, которые указывают на то, что Т-клетка не является «наивной» и/или подобной «наивной», и/или ассоциируется с «не-наивным» состоянием Т-клетки или с состоянием Т-клетки подобном «не-наивным».

[0199] Маркеры, которые указывают на то, что Т-клетка является «наивной» и/или является Т-клеткой, подобной «наивной», и/или ассоциированы с «наивным» состоянием Т-клеток или с состоянием, подобном «наивным», включают, без ограничения, CD27, CD28, CD45RA, CD62L и/или CCR7. В некоторых вариантах Т-клетки, подобные «наивным», например, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, подобные «наивным», являются положительными по экспрессии CD27, CD28, CD45RA, CD62L и/или CCR7. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетки, подобные «наивным», является положительными по поверхностной экспрессии одного или нескольких из CD27, CD28, CD45RA, CD62L и/или CCR7.

[0200] Маркеры, которые указывают на то, что клетка не является «наивной» и/или не является Т-клеткой, подобной «наивной», и/или ассоциированной с «не-наивным» состоянием Т-клеток или с состоянием, подобном «не-наивным», включают, без ограничения, CD25, CD45RO, CD56, KLRG1 и/или CD95. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, подобные «наивным», например, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, подобные «наивным», являются негативными по экспрессии CD25, CD45RO, CD56 и/или KLRG1. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетки, подобные «наивным», например, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, подобные «наивным», имеют низкую экспрессию маркера, связанного с «не-наивными» клетками, или с клетками, подобными «не-наивным» клеткам. В конкретных вариантах настоящего изобретения Т-клетки, подобные «наивным» клеткам, имеет низкую экспрессию CD95. В некоторых вариантах Т-клетки, подобные «наивным», является негативными по поверхностной экспрессии одного или нескольких из CD25, CD45RO, CD56 и/или KLRG1.

[0201] В некоторых вариантах осуществления, низкая экспрессия маркера, связанного с «не-наивными» клетками, или с клетками, подобными «не-наивным» клеткам, составляет или включает по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% от экспрессии маркера в клетках, которые представляют собой клетки, подобные «не-наивным», и/или клетки, которые являются положительными в отношении одного или нескольких маркеров, которые указывают, что Т-клетки находятся в «не-наивном» состоянии или в состоянии, подобном «не-наивном». В некоторых вариантах осуществления, низкая экспрессия маркера, связанного с «не-наивными» клетками, или с клетками, подобными «не-наивным» клеткам, составляет или равно по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 10%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 20%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 30%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 40%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95% или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99% от экспрессии маркера в эффекторных Т-клетках (T_{EFF}), Т-клетках памяти, Т-клетках центральной памяти (T_{CM}), Т-клетках эффекторной памяти (T_{EM}).

[0202] В некоторых вариантах осуществления изобретения, маркеры, которые указывают на то, что клетка не является «наивной» и/или не является Т-клеткой, подобной «наивной», и/или ассоциированной с «не-наивным» состоянием Т-клеток или с состоянием, подобном «не-наивным», включают один или несколько цитокинов. Например, в некоторых вариантах Т-клетки, которые не являются «наивными» и/или подобными «наивными», и/или ассоциируется с «не-наивным» состоянием Т-клеток или с состоянием, подобном «не-наивным», являются негативными по экспрессии и/или продуцирования одного или нескольких из IL-2, IFN-G, IL-4 и IL-10. В некоторых вариантах один или несколько цитокинов секретируются из клеток. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения один или несколько цитокинов экспрессируются внутри Т-клеток, подобных «не-наивным», например, во время или после обработки агентом, который предотвращает, ингибирует или снижает секрецию.

[0203] В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетка, подобная «наивной», является положительной по экспрессии, например поверхностной экспрессии, CD45RA и CCR7. В конкретных вариантах осуществления, CD4+ Т-клетка, подобная «наивной», является положительной по экспрессии, например поверхностной экспрессии, CD45RA и CCR7. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетка, подобная «наивной», является положительной по экспрессии, например поверхностной экспрессии, CD45RA и CCR7. В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетка, подобная

«наивной», является положительной по экспрессии, например поверхностной экспрессии, CD45RA, CD27 и CCR7, и является негативной по экспрессии, например, поверхностной экспрессии CD45RO. В конкретных вариантах CD4+ Т-клетка, подобная «наивной», является положительной по экспрессии, например поверхностной экспрессии, CD45RA, CD27 и CCR7, и является негативной по экспрессии, например поверхностной экспрессии CD45RO. В некоторых вариантах CD8+ Т-клетка, подобная «наивной», является положительной по экспрессии, например поверхностной экспрессии, CD45RA, CD27 и CCR7, и является негативной по экспрессии, например поверхностной экспрессии CD45RO.

[0204] В некоторых вариантах осуществления CD4+ и/или CD8+ Т-клетки являются жизнеспособными клетками. В некоторых вариантах осуществления CD4+ и/или CD8+ Т-клетки представляют собой жизнеспособные клетки, подобные «наивным» клеткам. Жизнеспособная клетка является положительной по экспрессии маркера, который указывает на то, что клетка подвергают нормальным функциональным клеточным процессам и/или не подверглась или не находится в процессе некроза или запрограммированной клеточной гибели. В некоторых вариантах жизнеспособность может быть оценена с помощью окислительно-восстановительного потенциала клетки, целостности клеточной мембраны или активности или функции митохондрий. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность представляет собой отсутствие специфической молекулы, связанной с клеточной гибелью, или отсутствие клеточной гибели, определенной в анализе.

[0205] В некоторых вариантах осуществления изобретения жизнеспособность клеток оценивают с помощью анализа, который может включать, без ограничения, анализы поглощения красителя (например, анализы кальцеина AM), анализы жизнеспособности клеток XTT и анализы исключения красителя (например, анализы исключения красителя трипанового синего, эозина или пропидия). В конкретных вариантах жизнеспособная клетка имеет негативную экспрессию одного или нескольких апоптозных маркеров, например, аннексина V или активной каспазы 3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения жизнеспособная клетка является негативной по экспрессии одного или нескольких маркеров апоптоза, которые могут включать, без ограничения, каспазу, например каспазу 2, каспазу 3, каспазу 6, каспазу 7, каспазу 8, каспазу 9 и каспазу 10, члены семейства Bcl-2, например Bax, Bax и Bid, аннексин V и/или негативной по окрашиванию TUNEL.

[0206] В некоторых вариантах осуществления экспрессия представляет собой или включает количество, уровень, концентрацию и/или наличие маркера. В конкретных вариантах осуществления маркером является полипептид. В некоторых вариантах осуществления маркером является мРНК. В некоторых вариантах осуществления экспрессия представляет собой или включает количество, уровень, концентрацию и/или присутствие полипептида, например, маркерного полипептида. В некоторых вариантах осуществления экспрессия представляет собой или включает количество, уровень,

концентрацию и/или присутствие полинуклеотида, например, мРНК или кДНК, происходящую из мРНК, который кодирует маркер. В некоторых вариантах экспрессия представляет собой или включает количество, уровень, концентрацию и/или наличие маркера на поверхности клетки или на поверхности клеточной мембраны. В конкретных вариантах экспрессия представляет собой или включает внутреннюю экспрессию, например, количество, уровень, концентрацию и/или наличие маркера внутри клетки, например, в цитозоле, ядре, эндоплазматическом ретикулуме и/или аппарате Гольджи.

[0207] В некоторых вариантах осуществления изобретения маркеры измеряют, оценивают и/или количественно определяют путем проведения анализа in vitro. В некоторых примерах анализ in vitro представляет собой иммунологический анализ, анализ на основе аптамера, гистологический или цитологический анализ или анализ уровня экспрессии мРНК. В некоторых случаях используемый анализ in vitro может представлять собой твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммуноблоттинг, иммунопреципитацию, радиоиммуноанализ (RIA), иммуноокрашивание, анализ проточной цитометрией, поверхностный плазмонный резонанс (SPR), хемилюминесцентный анализ, анализ с боковым потоком, анализ ингибирования или анализ авидности. В некоторых вариантах осуществления экспрессию маркеров измеряют, оценивают и/или количественно определяют по РНК-seq. В конкретных вариантах осуществления экспрессию маркеров измеряют, оценивают и/или количественно определяют методами иммуноокрашивания. В конкретных вариантах осуществления экспрессию маркеров измеряют, оценивают и/или количественно определяют методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления экспрессию маркеров измеряют, оценивают и/или количественно определяют с помощью внутреннего окрашивания цитокина.

[0208] В некоторых вариантах осуществления маркеры измеряют, оценивают и/или количественно определяют в клетках композиции CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 10%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 15%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 20%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 25%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 30%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 35%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 40%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 45%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 55%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 65%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по

меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 96%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 97%, или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99% CD4+ Т-клеток представляют собой CD4+ Т-клетки, подобные «наивным» клеткам. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество CD4+ Т-клеток, которые являются CD4+ Т-клетками, подобными «наивным» клеткам, составляет или равно от или приблизительно от 10% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 20% до или приблизительно до 60%, до или приблизительно до 25% от или приблизительно от 75%, до или приблизительно до 30% от или приблизительно от 80%, до или приблизительно до 40% от или приблизительно от 90%, до или приблизительно до 50% от или приблизительно от 100%, до или приблизительно до 30% от или приблизительно от 50%, до или приблизительно до 40% от или приблизительно от 60%,до или приблизительно до 50% от или приблизительно от 70%,до или приблизительно до 60% от или приблизительно от 80%, до или приблизительно до 70% от или приблизительно от 90%, до или приблизительно до 80% от или приблизительно от 100%, до или приблизительно до 5% от или приблизительно от 25%, до или приблизительно до 25% от или приблизительно от 50%, до или приблизительно до 50% от или приблизительно от 75%, или до или приблизительно до 75% до или приблизительно до 99%. В некоторых вариантах CD4+ Т-клетки, подобные «наивным», являются жизнеспособными CD4+ Т-клетками, подобными «наивным».

[0209] В некоторых вариантах осуществления маркеры измеряют, оценивают и/или количественно определяют в клетках CD8+ композиции Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 10%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 15%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 20%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 25%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 30%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 35%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 40%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 45%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 55%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 65%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 96%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 97%, или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99% CD4+ Т-клеток представляют собой CD8+ Т-клетки, подобные «наивным» клеткам. В некоторых

вариантах осуществления изобретения количество CD8+ Т-клеток, которые являются CD8+ Т-клетками, подобными «наивным» клеткам, составляет или равно от или приблизительно от 10% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 20% до или приблизительно до 60%, до или приблизительно до 25% от или приблизительно от 75%, до или приблизительно до 30% от или приблизительно от 80%, до или приблизительно до 40% от или приблизительно от 90%, до или приблизительно до 50% от или приблизительно от 100%, до или приблизительно до 30% от или приблизительно от 50%, до или приблизительно до 40% от или приблизительно от 60%,до или приблизительно до 50% от или приблизительно от 70%,до или приблизительно до 60% от или приблизительно от 80%, до или приблизительно до 70% от или приблизительно от 90%, до или приблизительно до 80% от или приблизительно от 100%, до или приблизительно до 5% от или приблизительно от 25%, до или приблизительно до 25% от или приблизительно от 50%, до или приблизительно до 50% от или приблизительно от 75%, или до или приблизительно до 75% до или приблизительно до 99%. В некоторых вариантах CD8+ Т-клетки, подобные «наивным», являются жизнеспособными CD8+ Т-клетками, подобными «наивным».

[0210] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки из композиции CD4+ Т-клеток смешивают или объединяют с клетками из композиции CD8+ Т-клеток в количествах и/или пропорциях, достаточных для получения входной композиции с соотношением CD4+ Т-клеток, подобных «наивным» клеткам, и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным» клеткам, составляющим или равным от 10:1 до 0,05:1, от 8:1 до 0,1:1, от 5:1 до 0,2:1, от 2,5:1 до 0,25:1, от 2,2:1 до 0,8:1, от 2:1 до 0,5:1 или от 1,5:1 до 1:1 включительно. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки смешивают в количествах и/или пропорциях, достаточных для для получения входной композиции с соотношением CD4+ Т-клеток, подобных «наивным» клеткам, и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным» клеткам, составляющим или равным от 2,2:1 до 0,8:1 включительно. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки смешивают или объединяют с соотношением CD4+ Т-клеток, подобных «наивным» клеткам, и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным» клеткам, составляющим или равным приблизительно 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 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, 1,0:1, 0,9:1 или 0,8:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки смешивают или объединяют в соотношении равном или приблизительно равном 1,1:1.

[0211] В некоторых вариантах осуществления изобретения все или все жизнеспособные CD4+ Т-клетки в количестве, равном или приблизительно равном 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1{,}0 \times 10^8$, $1{,}1 \times 10^8$, $1{,}2 \times 10^8$, $1{,}3 \times 10^8$, $1{,}4 \times 10^8$, $1{,}5 \times 10^8$, $1{,}6 \times 10^8$, $1{,}7 \times 10^8$, $1{,}8 \times 10^8$, $1{,}9 \times 10^8$, $2{,}0 \times 10^8$, $2{,}1 \times 10^8$, $2{,}2 \times 10^8$, $2{,}3 \times 10^8$, $2{,}4 \times 10^8$, $2{,}5 \times 10^8$, $2{,}6 \times 10^8$, $2{,}7 \times 10^8$, $2{,}8 \times 10^8$, $2{,}9 \times 10^8$, $3{,}0 \times 10^8$, $3{,}5 \times 10^8$, $4{,}0 \times 10^8$, $4{,}5 \times 10^8$, 5×10^8, 5×10^8 или 1×10^9 клеток, смешивают или объединяют со всеми или всеми жизнеспособными CD8+ Т-клетками в количестве, равном или приблизительно равном 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1{,}0 \times 10^8$, $1{,}1 \times 10^8$, $1{,}2 \times 10^8$, $1{,}3 \times 10^8$, $1{,}4 \times 10^8$, $1{,}5 \times 10^8$, $1{,}6 \times 10^8$, $1{,}7 \times 10^8$, $1{,}8 \times 10^8$,

1,9 x 10^8, 2,0 x 10^8, 2,1 x 10^8, 2,2 x 10^8, 2,3 x 10^8, 2,4 x 10^8, 2,5 x 10^8, 2,6 x 10^8, 2,7 x 10^8, 2,8 x 10^8, 2,9 x 10^8, 3,0 x 10^8, 3,5 x 10^8, 4,0 x 10^8 4,5 x 10^8, 5 × 10^8, 5,5 x 10^8, или 1 × 10^9 клеток, для получения входной композиции с определенным соотношением CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным». В некоторых вариантах осуществления все или все жизнеспособные CD4+ Т-клетки в количестве от 1 × 10^6 до 1 x 10^{10}, от 1 x 10^7 до 1 x 10^9, от 5 x 10^7 до 5 x 10^8 или от 1 x 10^8 до 3 x 10^8 клеток смешивают или объединяют со всеми или всеми жизнеспособными CD8+ Т-клетками в количестве от 1 × 10^6 до 1 × 10^{10}, от 1 × 10^7 до 1 × 10^9, от 5 × 10^7 до 5 × 10^8, или от 1 × 10^8 до 3 × 10^8 клеток, для получения входной композиции с определенным соотношением CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным».

[0212] В некоторых вариантах осуществления изобретения CD4+ Т-клетки, подобные «наивным», в количестве равном или приблизительно равном 1 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1,0 x 10^8, 1,1 x 10^8, 1,2 x 10^8, 1,3 x 10^8, 1,4 x 10^8, 1,5 x 10^8, 1,6 x 10^8, 1,7 x 10^8, 1,8 x 10^8, 1,9 x 10^8, 2,0 x 10^8, 2,1 x 10^8, 2,2 x 10^8, 2,3 x 10^8, 2,4 x 10^8, 2,5 x 10^8, 2,6 x 10^8, 2,7 x 10^8, 2,8 x 10^8, 2,9 x 10^8, 3,0 x 10^8, 3,5 x 10^8, 4,0 x 10^8, 4,5 x 10^8, 5 × 10^8, 5 × 10^8 или 1 × 10^9 клеток, смешивают или объединяют с CD8+ Т-клетками, подобными «наивным», в количестве равном или приблизительно равном 1 × 10^6, 5 × 10^6, 1 × 10^7, 5 × 10^7, 1,0 x 10^8, 1,1 x 10^8, 1,2 x 10^8, 1,3 x 10^8, 1,4 x 10^8, 1,5 x 10^8, 1,6 x 10^8, 1,7 x 10^8, 1,8 x 10^8, 1,9 x 10^8, 2,0 x 10^8, 2,1 x 10^8, 2,2 x 10^8, 2,3 x 10^8, 2,4 x 10^8, 2,5 x 10^8, 2,6 x 10^8, 2,7 x 10^8, 2,8 x 10^8, 2,9 x 10^8, 3,0 × 10^8, 3,5 × 10^8, 4,0 × 10^8, 4,5 × 10^8, 5 × 10^8, 5,5 × 10^8 или 1 × 10^9 клеток, для получения входной композиции с определенным соотношением CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным». В некоторых вариантах CD4+ Т-клетки, подобные «наивным», в количестве от 1 × 10^6 до 1 x 10^{10}, от 1 x 10^7 до 1 x 10^9, от 5 x 10^7 до 5 x 10^8 или от 1 x 10^8 до 3 x 10^8 клеток, смешивают или объединяют с CD8+ Т-клетками, подобными «наивным», в количестве от 1 × 10^6 до 1 × 10^{10}, от 1 × 10^7 до 1 × 10^9, от 5 × 10^7 до 5 × 10^8, или от 1 × 10^8 до 3 × 10^8 клеток, для получения входной композиции с определенным соотношением CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным».

[0213] В конкретных вариантах осуществления соотношение Т-клеток CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», во входной композиции было установлено, отрегулировано и/или изменено по сравнению с соотношением Т-клеток CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», в образце, например в биологическом образце. В конкретных вариантах осуществления соотношение Т-клеток CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным», составляет, приблизительно равно или по меньшей мере равно 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, или превышает в 1-раз, 1,5-раз, 2-раз, 2,5-раз, 3-раз, 4-раз, 5-раз, 10-раз, 20-раз, 50-раз, 100-раз соотношение в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец, из которого выделяют, отбирают и/или получают клетки входной композиции.

[0214] В некоторых вариантах осуществления изобретения, получение, образование и/или изготовление входной композиции включает одну или несколько стадий смешивания или комбинирования клеток композиции CD4+Т-клеток с клетками композиции CD8+ Т-клеток для получения входной композиции при соотношении от 2,2:1 до 0,8:1 CD4+ Т-клеток, подобных «наивным», и CD8+ Т-клеток, подобных «наивным». В конкретных вариантах количество, количество на единицу объема, количество по массе и/или долю, процентную долю клеток, подобных «наивным», измеряют, оценивают и/или количественно определяют в композиции CD4+ Т-клеток и в композиции CD8+ Т-клеток до смешивания или объединения. В некоторых вариантах количество, количество на единицу объема, количество по массе и/или долю, процентную долю клеток, подобных «наивным», измеряют, оценивают и/или количественно определяют путем детектирования CD45RA+ и CCR7+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения входная композиция имеет соотношение от 2,2:1 до 0,8:1 CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах входная композиция имеет соотношение CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток равное или приблизительно равное 1,1:1.

[0215] В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция клеток имеет соотношение, например, заданное, контролируемое и/или фиксированное соотношение CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления соотношения CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток находятся в пределах от 10:1 до 0,05:1, от 8:1 до 0,1:1, от 5:1 до 0,2:1, от 2,5:1 до 0,25:1, от 2,2:1 до 0,8:1, от 2:1 до 0,5:1 или от 1,5:1 до 1:1 включительно. В конкретных вариантах осуществления соотношение CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток находится в пределах от 2:1 до 0,8:1, от 1,6:1 до 0,8:1, от 1,4:1 до 0,8:1, от 1,2:1 до 0,8:1 или от 1,2:1 до 0,8:1 включительно. В некоторых вариантах осуществления соотношение составляет от 2,2:1 до 0,8:1 включительно. В некоторых вариантах соотношение CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток составляют приблизительно 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 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, 1,0:1, 0,9:1 или 0,8:1.

[0216] В конкретных вариантах осуществления изобретения, входная композиция клеток содержит или приблизительно содержит 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8, 5×10^8 или 1×10^9 всех клеток или всех жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления входная композиция клеток содержит или приблизительно содержит 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8, 5×10^8 или 1×10^9 клеток, которые

экспрессируют CD4 или CD8. В некоторых вариантах осуществления входная клеточная композиция содержит или приблизительно содержит 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1{,}0 \times 10^8$, $1{,}1 \times 10^8$, $1{,}2 \times 10^8$, $1{,}3 \times 10^8$, $1{,}4 \times 10^8$, $1{,}5 \times 10^8$, $1{,}6 \times 10^8$, $1{,}7 \times 10^8$, $1{,}8 \times 10^8$, $1{,}9 \times 10^8$, $2{,}0 \times 10^8$, $2{,}1 \times 10^8$, $2{,}2 \times 10^8$, $2{,}3 \times 10^8$, $2{,}4 \times 10^8$, $2{,}5 \times 10^8$, $2{,}6 \times 10^8$, $2{,}7 \times 10^8$, $2{,}8 \times 10^8$, $2{,}9 \times 10^8$, $3{,}0 \times 10^8$, $3{,}5 \times 10^8$, $4{,}0 \times 10^8$, $4{,}5 \times 10^8$, 5×10^8, 5×10^8 или 1×10^9 CD45RA+/CCR7+/CD4+ и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток.

[0217] В конкретных вариантах осуществления изобретения входная композиция клеток содержит от 1×10^6 до 1×10^{10}, от 1×10^7 до 1×10^9, от 5×10^7 до 5×10^8 или от 1×10^8 и 3×10^8 всех клеток или всех жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления входная композиция клеток содержит или приблизительно содержит от 1×10^6 до 1×10^{10}, от 1×10^7 до 1×10^9, от 5×10^7 до 5×10^8 или от 1×10^8 и 3×10^8 клеток, которые экспрессируют CD4 или CD8. В некоторых вариантах осуществления входная клеточная композиция содержит или приблизительно содержит от 1×10^6 до 1×10^{10}, от 1×10^7 до 1×10^9, от 5×10^7 до 5×10^8 или от 1×10^8 до 3×10^8 CD45RA+/CCR7+/CD4+ и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток.

[0218] В конкретных вариантах осуществления изобретения входная композиция клеток содержит или включает по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9%, или 100%, или приблизительно 100% CD45RA+/CCR7+ клеток. В конкретных вариантах осуществления входная композиция клеток содержит или включает не более 100%, не более 99%, не более 98%, не более 97%, не более 96%, не более 95%, не более 90% или не более 85% CD45RA+/CCR7+ клеток.

[0219] В некоторых вариантах осуществления изобретения все или все жизнеспособные CD4+ Т-клетки в количестве, равном или приблизительно равном 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1{,}0 \times 10^8$, $1{,}1 \times 10^8$, $1{,}2 \times 10^8$, $1{,}3 \times 10^8$, $1{,}4 \times 10^8$, $1{,}5 \times 10^8$, $1{,}6 \times 10^8$, $1{,}7 \times 10^8$, $1{,}8 \times 10^8$, $1{,}9 \times 10^8$, $2{,}0 \times 10^8$, $2{,}1 \times 10^8$, $2{,}2 \times 10^8$, $2{,}3 \times 10^8$, $2{,}4 \times 10^8$, $2{,}5 \times 10^8$, $2{,}6 \times 10^8$, $2{,}7 \times 10^8$, $2{,}8 \times 10^8$, $2{,}9 \times 10^8$, $3{,}0 \times 10^8$, $3{,}5 \times 10^8$, $4{,}0 \times 10^8$, $4{,}5 \times 10^8$, 5×10^8, 5×10^8 или 1×10^9 клеток, смешивают или объединяют со всеми или всеми жизнеспособными CD8+ Т-клетками в количестве, равном или приблизительно равном 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1{,}0 \times 10^8$, $1{,}1 \times 10^8$, $1{,}2 \times 10^8$, $1{,}3 \times 10^8$, $1{,}4 \times 10^8$, $1{,}5 \times 10^8$, $1{,}6 \times 10^8$, $1{,}7 \times 10^8$, $1{,}8 \times 10^8$, $1{,}9 \times 10^8$, $2{,}0 \times 10^8$, $2{,}1 \times 10^8$, $2{,}2 \times 10^8$, $2{,}3 \times 10^8$, $2{,}4 \times 10^8$, $2{,}5 \times 10^8$, $2{,}6 \times 10^8$, $2{,}7 \times 10^8$, $2{,}8 \times 10^8$, $2{,}9 \times 10^8$, $3{,}0 \times 10^8$, $3{,}5 \times 10^8$, $4{,}0 \times 10^8$ $4{,}5 \times 10^8$, 5×10^8, $5{,}5 \times 10^8$, или 1×10^9 клеток, для получения входной композиции с определенным соотношением CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления все или все жизнеспособные CD4+ Т-клетки в количестве от 1×10^6 до 1×10^{10}, от 1×10^7 до 1×10^9, от 5×10^7 до 5×10^8 или от 1×10^8 до 3×10^8 клеток

смешивают или объединяют со всеми или всеми жизнеспособными CD8+ Т-клетками в количестве от 1×10^6 до 1×10^{10}, от 1×10^7 до 1×10^9, от 5×10^7 до 5×10^8, или от 1×10^8 до 3×10^8 клеток, для получения входной композиции с определенным соотношением CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток.

[0220] В конкретных вариантах осуществления соотношение CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток во входной композиции отрегулированы, изменены и/или установлены по сравнению с соотношением CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток в образце, например, в биологическом образце. В конкретных вариантах осуществления изобретения, отрегулированное, измененное и/или установленное соотношение CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток равно или по меньшей мере равно 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, или превышает в 1-раз, 1,5-раз, 2-раз, 2,5-раз, 3-раз, 4-раз, 5-раз, 10-раз, 20-раз, 50-раз, 100-раз соотношение в биологическом образце. В некоторых вариантах образец представляет собой образец, из которого выделяют, отбирают и/или получают клетки входной композиции клеток.

[0221] В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция клеток имеет соотношение, например заданное, контролируемое и/или фиксированное соотношение, CD27+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления соотношение CD27+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеток находятся в пределах от 10:1 до 0,05:1, от 8:1 до 0,1:1, от 5:1 до 0,2:1, от 2,5:1 до 0,25:1, от 2,2:1 до 0,8:1, от 2:1 до 0,5:1 или от 2:1 до 1:1 включительно. В конкретных вариантах осуществления соотношение CD27+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеток находится в пределах от 2:1 до 0,8:1, от 1,8:1 до 1:1, от 1,8:1 до 1,2:1, от 1,2:1 до 1,4:1 или от 1,8:1 до 1,6:1 включительно. В некоторых вариантах это соотношение находится в пределах от 1,8:1 до 1,6:1, включительно. В некоторых вариантах соотношение CD27+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеток составляет приблизительно 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,69:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1 или 1,3:1. В некоторых вариантах соотношение равно или приблизительно равно 1,69:1.

[0222] В конкретных вариантах осуществления изобретения входная композиция клеток содержит или приблизительно содержит 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8, 5×10^8 или 1×10^9 всех клеток или всех жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления входная композиция клеток содержит или приблизительно содержит 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8, 5×10^8 или 1×10^9 клеток, которые

экспрессируют CD4 или CD8. В некоторых вариантах осуществления входная клеточная композиция содержит или приблизительно содержит 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8, 5×10^8 или 1×10^9 CD27+/CCR7+/CD4+ и CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеток.

[0223] В конкретных вариантах осуществления изобретения входная композиция клеток содержит от 1×10^6 до 1×10^{10}, от 1×10^7 до 1×10^9, от 5×10^7 до 5×10^8 или от 1×10^8 и 3×10^8 всех клеток или всех жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления входная композиция клеток содержит или приблизительно содержит от 1×10^6 до 1×10^{10}, от 1×10^7 до 1×10^9, от 5×10^7 до 5×10^8 или от 1×10^8 и 3×10^8 клеток, которые экспрессируют CD4 или CD8. В некоторых вариантах осуществления входная клеточная композиция содержит или приблизительно содержит от 1×10^6 до 1×10^{10}, от 1×10^7 до 1×10^9, от 5×10^7 до 5×10^8 или от 1×10^8 до 3×10^8 CD27+/CCR7+/CD4+ и CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеток.

[0224] В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция входной клетки содержит по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 10%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 20%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 30%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 40%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 96%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 97%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 98%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,9%, или 100% или приблизительно 100% CD27+/CCR7+ клеток. В конкретных вариантах осуществления входная композиция содержит или включает не более или приблизительно не более 100%, не более или приблизительно не более 99%, не более или приблизительно не более 98%, не более или приблизительно не более 97%, не более или приблизительно не более 96%, не более или приблизительно не более 95%, не более или приблизительно не более 90% или не более или приблизительно не более 85% CD27+/CCR7+ клеток.

[0225] В некоторых вариантах осуществления изобретения все или все жизнеспособные CD4+ Т-клетки в количестве, равном или приблизительно равном 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times$

10^8, 2,7 x 10^8, 2,8 x 10^8, 2,9 x 10^8, 3,0 x 10^8, 3,5 x 10^8, 4,0 x 10^8, 4,5 x 10^8, 5 × 10^8, 5 × 10^8 или 1 × 10^9 клеток, смешивают или объединяют со всеми или всеми жизнеспособными CD8+ Т-клетками в количестве, равном или приблизительно равном 1 × 10^6, 5 × 10^6, 1 × 10^7, 5 x 10^7, 1,0 x 10^8, 1,1 x 10^8, 1,2 x 10^8, 1,3 x 10^8, 1,4 x 10^8, 1,5 x 10^8, 1,6 x 10^8, 1,7 x 10^8, 1,8 x 10^8, 1,9 x 10^8, 2,0 x 10^8, 2,1 x 10^8, 2,2 x 10^8, 2,3 x 10^8, 2,4 x 10^8, 2,5 x 10^8, 2,6 x 10^8, 2,7 x 10^8, 2,8 x 10^8, 2,9 x 10^8, 3,0 x 10^8, 3,5 x 10^8, 4,0 x 10^8 4,5 x 10^8, 5 × 10^8, 5,5 x 10^8, или 1 × 10^9 клеток, для получения входной композиции с определенным соотношением CD27+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления все или все жизнеспособные CD4+ Т-клетки в количестве от 1 × 10^6 до 1 x 10^{10}, от 1 x 10^7 до 1 x 10^9, от 5 x 10^7 до 5 x 10^8 или от 1 x 10^8 до 3 x 10^8 клеток смешивают или объединяют со всеми или всеми жизнеспособными CD8+ Т-клетками в количестве от 1 × 10^6 до 1 × 10^{10}, от 1 × 10^7 до 1 × 10^9, от 5 × 10^7 до 5 × 10^8, или от 1 × 10^8 до 3 × 10^8 клеток, для получения входной композиции с определенным соотношением CD27+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеток.

[0226] В конкретных вариантах осуществления соотношение CD27+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеток во входной композиции отрегулированы, изменены и/или установлены по сравнению с соотношением CD27+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеток в образце, например, в биологическом образце. В конкретных вариантах осуществления изобретения, отрегулированное, измененное и/или установленное соотношение CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток равно или по меньшей мере равно 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, или превышает в 1-раз, 1,5-раз, 2-раз, 2,5-раз, 3-раз, 4-раз, 5-раз, 10-раз, 20-раз, 50-раз, 100-раз соотношение в биологическом образце. В некоторых вариантах образец представляет собой образец, из которого выделяют, отбирают и/или получают клетки входной композиции клеток.

[0227] В некоторых вариантах осуществления изобретения входная композиция клеток имеет соотношение, например, определенное, контролируемое и/или фиксированное соотношение, CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления соотношение CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеток составляет от 10:1 до 0,05:1, от 8:1 до 0,1:1, от 5:1 до 0,2:1, от 2,5:1 до 0,25:1, от 2,2:1 до 0,8:1, от 2:1 до 0,5:1 или от 1,5:1 до 1:1 включительно. В конкретных вариантах осуществления соотношение CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеток находится в пределах от 2:1 до 0,8:1, от 1,6:1 до 0,8:1, от 1,4:1 до 0,8:1, от 1,2:1 до 0,8:1 или от 1,2:1 до 0,8:1 включительно. В некоторых вариантах это соотношение составляет от 2,2:1 до 0,8:1 включительно. В некоторых вариантах соотношение CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеток равно или приблизительно равно 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 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, 1,0:1, 0,9:1 или 0,8:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение равно или приблизительно равно 1,1:1.

[0228] В конкретных вариантах осуществления изобретения входная композиция клеток содержит от 1×10^6 до 1×10^{10}, от 1×10^7 до 1×10^9, от 5×10^7 до 5×10^8, или от 1×10^8 до 3×10^8 всех клеток или всех жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления входная композиция входной содержит от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 1×10^{10}, от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до 1×10^9, от или приблизительно от 5×10^7 до или приблизительно до 5×10^8, от или приблизительно от 1×10^8 до или приблизительно до 3×10^8 клеток, которые экспрессируют CD4 или CD8. В некоторых вариантах осуществления входная композиция клеток содержит CD62L-/CCR7+/CD4+ и CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клетки в количестве, составляющем или приблизительно составляющим от 1×10^6 до 1 × 10 10, от 1×10^7 до 1×10^9, от 5×10^7 до 5×10^8, или от 1×10^8 до 3×10^8.

[0229] В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция входной клетки содержит по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 10%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 20%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 30%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 40%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 96%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 97%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 98%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,9%, или 100% или приблизительно 100% CD62L+/CCR7+ клеток. В конкретных вариантах осуществления входная композиция содержит или включает не более или приблизительно не более 100%, не более или приблизительно не более 99%, не более или приблизительно не более 98%, не более или приблизительно не более 97%, не более или приблизительно не более 96%, не более или приблизительно не более 95%, не более или приблизительно не более 90%, или не более или приблизительно не более 85% CD62L +/CCR7+ клеток.

0230] В некоторых вариантах осуществления изобретения все или все жизнеспособные CD4+ Т-клетки в количестве, равном или приблизительно равном 1 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1,0 x 10^8, 1,1 x 10^8, 1,2 x 10^8, 1,3 x 10^8, 1,4 x 10^8, 1,5 x 10^8, 1,6 x 10^8, 1,7 x 10^8, 1,8 x 10^8, 1,9 x 10^8, 2,0 x 10^8, 2,1 x 10^8, 2,2 x 10^8, 2,3 x 10^8, 2,4 x 10^8, 2,5 x 10^8, 2,6 x 10^8, 2,7 x 10^8, 2,8 x 10^8, 2,9 x 10^8, 3,0 x 10^8, 3,5 x 10^8, 4,0 x 10^8, 4,5 x 10^8, 5×10^8, 5×10^8 или 1×10^9 клеток, смешивают или объединяют со всеми или всеми жизнеспособными CD8+ Т-клетками в количестве, равном или приблизительно равном 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5 x 10^7, 1,0 x 10^8, 1,1 x 10^8, 1,2 x 10^8, 1,3 x 10^8, 1,4 x 10^8, 1,5 x 10^8, 1,6 x 10^8, 1,7 x 10^8, 1,8 x 10^8,

1,9 x 10^8, 2,0 x 10^8, 2,1 x 10^8, 2,2 x 10^8, 2,3 x 10^8, 2,4 x 10^8, 2,5 x 10^8, 2,6 x 10^8, 2,7 x 10^8, 2,8 x 10^8, 2,9 x 10^8, 3,0 x 10^8, 3,5 x 10^8, 4,0 x 10^8 4,5 x 10^8, 5 × 10^8, 5,5 x 10^8, или 1 × 10^9 клеток, для получения входной композиции клеток с определенным соотношением CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления все или все жизнеспособные CD4+ Т-клетки в количестве от 1 × 10^6 до 1 x 10^{10}, от 1 x 10^7 до 1 x 10^9, от 5 x 10^7 до 5 x 10^8 или от 1 x 10^8 до 3 x 10^8 клеток смешивают или объединяют со всеми или всеми жизнеспособными CD8+ Т-клетками в количестве от 1 × 10^6 до 1 × 10^{10}, от 1 × 10^7 до 1 × 10^9, от 5 × 10^7 до 5 × 10^8, или от 1 × 10^8 до 3 × 10^8 клеток, для получения входной композиции с определенным соотношением CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеток.

[0231] В конкретных вариантах осуществления соотношение CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеток во входной композиции отрегулированы, изменены и/или установлены по сравнению с соотношением CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеток в образце, например, в биологическом образце. В конкретных вариантах осуществления изобретения, отрегулированное, измененное и/или установленное соотношение CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеток равно или по меньшей мере равно 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, или превышает в 1-раз, 1,5-раз, 2-раз, 2,5-раз, 3-раз, 4-раз, 5-раз, 10-раз, 20-раз, 50-раз, 100-раз соотношение в биологическом образце. В некоторых вариантах образец представляет собой образец, из которого выделяют, отбирают и/или получают клетки входной композиции клеток.

[0232] В некоторых вариантах осуществления изобретения, получение, образование и/или изготовление входной композиции включает одну или несколько стадий смешивания или комбинирования клеток композиции CD4+Т-клеток с клетками композиции CD8+ Т-клеток для получения входной композиции с соотношением CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток от 2,2:1 до 0,8:1. В конкретных вариантах количество, количество на единицу объема, количество по массе и/или долю, процентную долю CD45RA+/CCR7+ клеток измеряют, оценивают и/или количественно определяют в композиции CD4+ Т-клеток и в композиции CD8+ Т-клеток до смешивания или объединения. В некоторых вариантах количество, количество на единицу объема, количество по массе и/или долю, процентную долю CD45RA+/CCR7+ клеток измеряют, оценивают и/или количественно определяют путем детектирования CD45RA+/CCR7+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения входная композиция клеток имеет соотношение CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток от 2,2:1 до 0,8:1. В некоторых вариантах осуществления входная композиция клеток имеет соотношение CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток равное или приблизительно равное 1,1:1.

[0233] В некоторых вариантах осуществления получение, образование и/или изготовление входной композиции клеток включает одну или несколько стадий смешивания или комбинирования клеток композиции CD4+ Т-клеток с клетками

композиции CD8+ Т-клеток для получения входной композиции клеток с соотношением CD27+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеток от 2,4:1 до 1:1. В конкретных вариантах количество, количество на единицу объема, количество по массе и/или долю, процентную долю CD27+/CCR7+ клеток измеряют, оценивают и/или количественно определяют в композиции CD4+ Т-клеток и в композиции CD8+ Т-клеток до смешивания или объединения. В некоторых вариантах количество, количество на единицу объема, количество по массе и/или долю, процентную долю CD27+/CCR7+ клеток измеряют, оценивают и/или количественно определяют путем детектирования CD27+/CCR7+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения входная композиция клеток имеет соотношение CD27+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеток от 2,4:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления входная композиция клеток имеет соотношение CD27+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD27+/CCR7+/CD8+ Т-клеток равное или приблизительно равное 1,69:1.

[0234] В некоторых вариантах осуществления получение, образование и/или изготовление входной композиции клеток включает одну или несколько стадий смешивания или комбинирования клеток композиции CD4+ Т-клеток с клетками композиции CD8+ Т-клеток для получения входной композиции клеток с соотношением CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеток от 2,2:1 до 0,8:1. В конкретных вариантах количество, количество на единицу объема, количество по массе и/или долю, процентную долю CD62L-/CCR7+ клеток измеряют, оценивают и/или количественно определяют в композиции CD4+ Т-клеток и в композиции CD8+ Т-клеток до смешивания или объединения. В некоторых вариантах количество, количество на единицу объема, количество по массе и/или долю, процентную долю CD62L-/CCR7+ клеток измеряют, оценивают и/или количественно определяют путем детектирования CD62L-/CCR7+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения входная композиция клеток имеет соотношение CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеток от 2,2:1 до 0,8:1. В некоторых вариантах осуществления входная композиция клеток имеет соотношение CD62L-/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD62L-/CCR7+/CD8+ Т-клеток равное или приблизительно равное 1,1:1.

В Активация и стимуляция

[0235] В некоторых вариантах осуществления предлагаемые способы используют для инкубирования клеток в условиях стимуляции. В некоторых вариантах осуществления условия стимуляции включают условия, которые активируют или стимулируют, и/или способны переносить или стимулировать сигналы в клетке, например в CD4+ Т-клетке, включая сигнал, генерируемый TCR и/или корецептором. В некоторых вариантах условия стимуляции включают одну или несколько стадий культивирования, культивирования, инкубирования, активации, размножения клеток с использованием и/или в присутствии стимулирующего реагента, например реагента, который активирует или стимулирует, и/или способен переносить или стимулировать сигнал в клетке. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент стимулирует и/или активирует TCR и/или

корецептор. В конкретных вариантах осуществления стимулирующим реагентом является реагент, представленный в настоящем документе, например, описанный в Разделе I-B-1.

[0236] В некоторых вариантах осуществления изобретения одну или несколько композиций обогащенных Т-клеток инкубируют при стимулирующих условиях до стадии генетической инженерии клеток, например, путем трансфекции и/или трансдукции клеток, например способом, представленным в настоящем описании, например способом, описанным в Разделе I-C в конкретных вариантах осуществления изобретения композиция обогащенных Т-клеток, которую инкубируют при стимулирующих условиях, представляет собой входную композицию. В некоторых вариантах осуществления клетки входных композиций предварительно выделяют, отбирают, обогащают или получают из биологического образца. В конкретных вариантах клетки входной композиции предварительно криогенно замораживают, хранят и оттаивают перед инкубацией.

[0237] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложенные способы используют с проведением одной или нескольких стадий обработки, которые включают стадию стимуляции клеток, таких как клетки входных композиций. В некоторых вариантах осуществления инкубирование может быть проведено до или вместе со стадией конструирования/инженерии, такой как генетическая инженерия, включающая описанные здесь варианты трансдукции, например, способы, описанные в Разделе I-C. В некоторых вариантах осуществления стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток, например, до стадии конструирования/инженерии, например трансдукции.

[0238] В некоторых вариантах осуществления стадии обработки включают инкубирование клеток, таких как входные клетки и/или клетки входной композиции, и при этом стадии инкубирования могут включать культивирование, стимуляцию, активацию и/или размножение клеток. В некоторых вариантах осуществления композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего агента. Такие условия включают условия, которые предназначены для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для примирования клеток для операций генной инженерии, таких как введение рекомбинантного антигена-рецептора.

[0239] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, например, клетки входной композиции, инкубируют, например, в условиях стимуляции, таких как в присутствии стимулирующего реагента, при плотности менее или приблизительно менее 5×10^7 клеток/мл, 4×10^7 клеток/мл, 3×10^7 клеток/мл, 2×10^7 клеток/мл, 1×10^7 клеток/мл, 9×10^6 клеток/мл, 8×10^6 клеток/мл, 7×10^6 клеток/мл, 6×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 4×10^6 клеток/мл или 3×10^6 клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют при плотности менее 5×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют при плотности от 1×10^3 клеток/мл до 1×10^9 клеток/мл, от 1×10^4 клеток/мл до 1×10^8 клеток/мл, от 1×10^5 клеток/мл до 1×10^7 клеток/мл, от 5×10^5 клеток/мл до 1×10^7 клеток/мл, от 1×10^6 клеток/мл до 5×10^6 клеток/мл или от 3×10^6 клеток/мл до 5 x 10^6 клеток/мл. В конкретных вариантах

осуществления клетки инкубируют при плотности равной или приблизительно равной 1×10^6 клеток/мл, $1\ 5 \times 10^6$ клеток/мл, 2×10^6 клеток/мл, $2{,}5 \times 10^6$ клеток/мл, 3×10^6 клеток/мл, $3{,}5 \times 10^6$ клеток/мл, 4×10^6 клеток/мл, $4{,}5 \times 10^6$ клеток/мл или 5×10^6 клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют при плотности равной или приблизительно равной 3×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления клетки являются жизнеспособными клетками. В некоторых вариантах клетки являются негативными в отношении маркер апоптоза, например, аннексина V или активированной каспазы 3. В конкретных вариантах клетки представляют собой или включают CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки.

[0240] В конкретных вариантах осуществления изобретения индикаторы жизнеспособности клеток включают, без ограничения, индикаторы клеточной репликации, митохондриальную функцию, энергетический баланс, целостность мембраны и уровень гибели клеток. В некоторых вариантах осуществления индикаторы жизнеспособности дополнительно включают индикаторы окислительного стресса, метаболической активации, метаболической устойчивости, ферментативной индукции, ингибирования ферментов и взаимодействия с мембранными переносчиками клеток. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособные клетки включают клетки, в которых протекают нормальные функциональные клеточные процессы, и/или клетки, которые не подверглись или не подвергаются процессу воздействия на некроз или на запрограммированную гибель клеток. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность клеток может быть оценена с помощью окислительно-восстановительного потенциала клетки, путем целостности клеточной мембраны или активности или функции митохондрий. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность характеризуется по отсутствию специфической молекулы, связанной с гибелью клеток, или по отсутствие указания гибели клеток, определенной в анализе. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность клеток может быть определена, измерена и/или оценена с помощью ряда стандартных способов. Неограничивающие примеры таких анализов жизнеспособности включают, без ограничения, анализы поглощения красителя (например, анализы кальцеина АМ), анализы жизнеспособности клеток XTT и анализы исключения красителя (например, трипанового синего, или тест по исключению эозинового или пропидиевого красителя). Анализы жизнеспособности применяют для определения количества или процентной доли (например, уровня) жизнеспособных клеток в образце клеток, композиции клеток и/или в пробе клеток.

[0241] В конкретных вариантах осуществления, апоптозный маркер может включать любой известный маркер, связанный с апоптозом, и может быть связан с экспрессией генов, белков или активных форм белков, или с появлением признаков, связанных с апоптозом, таких как истощение и/или разрушение ядер. В некоторых вариантах осуществления апоптозный маркер представляет собой маркер, связанный с апоптозом, который может включать, без ограничения, проапоптотические факторы, которые, как известно, инициируют апоптоз, члены пути рецептора гибели,

активированные члены (присущие) митохондриального пути, члены семейства Bcl-2, такие как Bax, Bad и Bid, Fas, FADD, наличие уплотнения ядра (регистрируемое, например, при микроскопическом контроле), наличие фрагментации хромосомной ДНК (например, наличие маркера длины хромосомной ДНК) или маркеры, связанные с анализом апоптоза, например окрашиванием TUNEF и окрашиванием аннексином V. В некоторых вариантах маркером апоптоза является экспрессия каспазы, например экспрессия активных форм каспазы-1, каспазы-2, каспазы-3, каспазы-7, каспазы-8, каспазы-9, каспазы-10 и/или каспазы-L3. В некоторых вариантах апоптозный маркер представляет собой аннексин V. В некоторых вариантах апоптозный маркер представляет собой активную каспазу-3.

[0242] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, например клетки входной композиции, в количестве от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до $500{,}000 \times 10^6$ клеток, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до $50{,}000 \times 10^6$ клеток, от или приблизительно от10×10^6 до или приблизительно до $5{,}000 \times 10^6$ клеток, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до $1{,}000 \times 10^6$ клеток, от или приблизительно от 50×10^6 до или приблизительно до 5000×10^6 клеток, от или приблизительно от 10×10^6 до или приблизительно до 1000×10^6 клеток, от или приблизительно от 100×10^6 до или приблизительно до 2500×10^6 клеток, инкубируют, например, при стимулирующих условиях, таких как в присутствии стимулирующего реагента. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 50×10^6 клеток, 100×10^6 клеток, 150×10^6 клеток, 200×10^6 клеток, 250×10^6 клеток, 300×10^6 клеток, 350×10^6 клеток, 400×10^6 клеток, 450×10^6 клеток или 500×10^6 клеток инкубируют, например, при стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления клетки являются жизнеспособными клетками. В некоторых конкретных вариантах осуществления клетки являются негативными по маркеру апоптоза, например, по аннексину V или активированной каспазе-3. В конкретных вариантах осуществления клетки представляют собой или включают CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки.

[0243] В некоторых вариантах осуществления изобретения CD4+ Т-клетки, например CD4+ Т-клетки входной композиции, в количестве от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до 25000×10^6, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 25000×10^6, от или приблизительно от 10×10^6 до или приблизительно до 2500×10^6, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 500×10^6, от или приблизительно от 50×10^6 до или приблизительно до 2500×10^6, от или приблизительно от 10×10^6 до или приблизительно до 500×10^6, от или приблизительно от 50×10^6 до или приблизительно до 300×10^6 клеток инкубируют, например, при стимулирующих условиях, например, в присутствии стимулирующего реагента. В конкретных вариантах осуществления инкубируют по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 25×10^6, 50×10^6, 75×10^6, 100×10^6, 125×10^6, 150×10^6, 175×10^6, 200×10^6, 225×10^6 или 250×10^6 CD4+ Т-клеток, например, при стимулирующих условиях. В

некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетки являются жизнеспособными CD4+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетки являются негативными по маркеру апоптоза, например, по аннексину V или активированной каспазе-3.

[0244] В некоторых вариантах осуществления изобретения CD8+ Т-клетки, например CD8+ Т-клетки входной композиции, в количестве от или приблизительно от 1 × 10^5 до или приблизительно до 25000 × 10^6, от или приблизительно от 1 × 10^6 до или приблизительно до 25000 × 10^6, от или приблизительно от 10 × 10^6 до или приблизительно до 2500 × 10^6, от или приблизительно от 1 × 10^6 до или приблизительно до 500 × 10^6, от или приблизительно от 50 × 10^6 до или приблизительно до 2500 × 10^6, от или приблизительно от 10 × 10^6 до или приблизительно до 500 × 10^6, от или приблизительно от 50 × 10^6 до или приблизительно до 300 × 10^6 клеток инкубируют, например, при стимулирующих условиях, например, в присутствии стимулирующего реагента. В конкретных вариантах осуществления инкубируют по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 25 × 10^6, 50 × 10^6, 75 × 10^6, 100 × 10^6, 125 × 10^6, 150 × 10^6, 175 × 10^6, 200 × 10^6, 225 × 10^6 или 250 × 10^6 CD8+ Т-клеток, например, при стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки являются жизнеспособными CD8+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки являются негативными по маркеру апоптоза, например, по аннексину V или активированной каспазе-3.

[0245] В некоторых вариантах осуществления условия для стимуляции и/или активации могут включать одно или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, агентов, таких как питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры связывания, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток.

[0246] В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия или стимулирующие реагенты включают один или несколько реагентов, например лиганд, который способен стимулировать или активировать внутриклеточный сигнальный домен TCR-комплекса. В некоторых аспектах агент запускает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке. Такие агенты могут быть пригодными для формирования первичного сигнала, например, для инициирования активации ITAM-индуцированного сигнала, например такого, который специфичен для компонента TCR, например, анти-CD3, и/или представлять собой агент, который стимулирует костимуляторный сигнал, такой как специфический для костимулирующего рецептора Т-клеток, например, анти-CD28 или анти-4-BB, в частности, связанный с твердым носителем, таким как шарик, и/или стимулирует один или несколько цитокинов. в качестве стимулирующих реагентов могут использоваться анти-CD3/анти-CD28-шарики (например, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander и/или шарики ExpACT®). Необязательно, способ размножения может дополнительно включать стадию добавления

анти-CD3- и/или анти-CD28-антитела к культуральной среде. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие агенты включают цитокины.

[0247] В конкретных вариантах осуществления изобретения условия стимуляции включают инкубирование и/или культивирование клеток с использованием стимулирующего реагента. В конкретных вариантах осуществления стимулирующим реагентом является реагент, представленный в настоящем документе, например реагент, описанный в Разделе I-B-1. в некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит или включает шарик. В некоторых вариантах осуществления начало и/или инициирование инкубирования и/или культивирования клеток в условиях стимуляции происходит, когда клетки контактируют и/или инкубируют со стимулирующим реагентом. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют до, во время и/или после стадии генной инженерии клеток, например, введения рекомбинантного полинуклеотида в клетку, например, трансдукцией или трансфекцией.

[0248] В некоторых вариантах осуществления изобретения, композицию обогащенных Т-клеток инкубируют при соотношении стимулирующего реагента и/или шариков и клеток, равном или приблизительно равном 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,5:1, 1,25:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,75:1, 0,67:1, 0,5:1, 0,3:1 или 0,2:1. В конкретных вариантах осуществления соотношение стимулирующего реагента и/или гранул и клеток находится в пределах от 2,5:1 до 0,2:1, от 2:1 до 0,5:1, от 1,5:1 до 0,75:1, от 1,25:1 до 0,8:1, от 1,1:1 до 0,9:1. В конкретных вариантах осуществления соотношение стимулирующего реагента и клеток составляет приблизительно 1:1 или составляет 1:1

[0249] В конкретных вариантах осуществления условия стимуляции включают инкубирование и/или культивирование клеток, например клеток из входной композиции, и/или инкубирование и/или культивирование клеток в присутствии одного или нескольких цитокинов. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов являются рекомбинантными цитокинами. В некоторых вариантах один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины человека. В некоторых вариантах осуществления один или несколько цитокинов связываются и/или способны связываться с рецепторами, которые экспрессируются Т-клетками и/или являются эндогенными по отношению к Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают член семейства 4-альфа-спиральных пучков цитокинов. В некоторых вариантах члены семейства 4-альфа-спиральных пучков цитокинов включают, без ограничения, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-7. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-2.

[0250] В некоторых вариантах осуществления изобретения количество или концентрация одного или нескольких цитокинов измеряют и/или количественно определяют в международных единицах (МЕ). Международные единицы могут использоваться для количественного определения витаминов, гормонов, цитокинов, вакцин, продуктов крови и подобных биологически активных веществ. В некоторых вариантах осуществления МЕ являются или включают единицы измерения активности биологических препаратов по сравнению с международным эталонным стандартом, например, стандартом ВОЗ для IL-2 человека (WHO 1st International Standard for Human IL-2, 86/504). Международные единицы являются единственным признанным и стандартизированным способом для сравнения единиц биологической активности, которые опубликованы или получены из результатов опубликованных исследований. В конкретных вариантах осуществления, значение МЕ для композиции, образца или источника цитокина может быть получено путем сравнительной проверки продукта с аналогичным стандартным продуктом ВОЗ. Например, в некоторых вариантах осуществления значение МЕ/мг для композиции, образца или источника рекомбинантного IL-2, IL-7 или IL-15 человека сравнивают со стандартизированными продуктами ВОЗ: стандарт ВОЗ IL-2 (NIBSC код: 86/500), стандарт ВОЗ IL-17 (NIBSC код: 90/530) и W стандарт ВОЗ IL-15 (NIBSC код: 95/554), соответственно.

[0251] В некоторых вариантах осуществления биологическая активность в МЕ/мг эквивалентна (ED_{50} в нг/мл) величине 1×10^6. В конкретных вариантах осуществления величина ED_{50} рекомбинантного IL-2 или IL-15 человека эквивалентна концентрации, необходимой для достижения половины максимальной стимуляции процесса пролиферации клеток (разделение XTT) с клетками CTLL-2. В некоторых вариантах осуществления ED_{50} рекомбинантного IL-7 человека эквивалентна концентрации, необходимой для достижения половины максимальной стимуляции процесса пролиферации PHA-активированных лимфоцитов периферической крови человека. Подробности, относящиеся к анализам и расчетам величин МЕ для IL-2, обсуждаются в публикации Wadhwa et al., Journal of Immunological Methods (2013), 379 (1-2): 1-7; и в публикации Gearing and Thorpe, Journal of Immunological Methods (1988), 114 (1-2): 3-9; подробности, относящиеся к анализам и расчетам величин МЕ для IL-15, обсуждаются в публикации Soman et al. Journal of Immunological Methods (2009) 348 (1-2): 83-94.

[0252] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, например, входные клетки, инкубируют с цитокином, например, рекомбинантным цитокином человека, при концентрации от или приблизительно от 1 МЕ/мл до или приблизительно до 1000 МЕ/мл, от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 50 МЕ/мл, от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 100 МЕ/мл, от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл, от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, от или приблизительно от 250 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, или от или приблизительно от 500 МЕ/мл до или приблизительно до 1000 МЕ/мл.

[0253] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, например, входные клетки, инкубируют с IL-2, например, с рекомбинантным IL-2 человека, при концентрации от или приблизительно от 1 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 250 МЕ/мл, от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл, от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 150 МЕ/мл, от или приблизительно от 75 МЕ/мл до или приблизительно до 125 МЕ/мл, от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл, или от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 100 МЕ/мл, например, в бессывороточной среде. В конкретных вариантах осуществления изобретения, клетки, например, клетки входной композиции, инкубируют с рекомбинантным IL-2 в концентрации, равной или приблизительно равной 50 МЕ/мл, 60 МЕ/мл, 70 МЕ/мл, 80 МЕ/мл, 90 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 110 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 130 МЕ/мл, 140 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 160 МЕ/мл, 170 МЕ/мл, 180 МЕ/мл, 190 МЕ/мл или 100 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления клетки, например входные клетки, инкубируют в присутствии рекомбинантного IL-2, например, рекомбинантного IL-2 человека, при его концентрации равной или приблизительно равной 100 МЕ/мл.

[0254] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, например, входные клетки, инкубируют с рекомбинантным IL-7, например, рекомбинантным IL-7 человека, при концентрации от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 2000 МЕ/мл, от или приблизительно от 500 МЕ/мл до или приблизительно до 1000 МЕ/мл, от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, от или приблизительно от 500 МЕ/мл до или приблизительно до 750 МЕ/мл, от или приблизительно от 750 МЕ/мл до или приблизительно до 1000 МЕ/мл, или от или приблизительно от 550 МЕ/мл до или приблизительно до 650 МЕ/мл, например, в бессывороточной среде. В конкретных вариантах осуществления изобретения, клетки, например, клетки входной композиции, инкубируют с рекомбинантным IL-7 в концентрации, равной или приблизительно равной 50 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 250 МЕ/мл, 300 МЕ/мл, 350 МЕ/мл, 400 МЕ/мл, 450 МЕ/мл, 500 МЕ/мл, 550 МЕ/мл, 600 МЕ/мл, 650 МЕ/мл, 700 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 800 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 750 МЕ/мл или 1000 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления клетки, например входные клетки, инкубируют в присутствии IL-7, например рекомбинантного IL-7 человека, при его концентрации равной или приблизительно равной 600 МЕ/мл.

[0255] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, например, входные клетки, инкубируют с IL-15, например, с рекомбинантным IL-15 человека, при концентрации от или приблизительно от 1 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 250 МЕ/мл, от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл, от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 150 МЕ/мл, от или приблизительно от 75 МЕ/мл до или приблизительно до 125 МЕ/мл, от или

приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл, или от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 100 МЕ/мл, например, в бессывороточной среде. В конкретных вариантах осуществления изобретения, клетки, например, клетки входной композиции, инкубируют с рекомбинантным IL-15 в концентрации, равной или приблизительно равной 50 МЕ/мл, 60 МЕ/мл, 70 МЕ/мл, 80 МЕ/мл, 90 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 110 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 130 МЕ/мл, 140 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 160 МЕ/мл, 170 МЕ/мл, 180 МЕ/мл, 190 МЕ/мл или 100 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления клетки, например входные клетки, инкубируют в присутствии рекомбинантного IL-15, например, рекомбинантного IL-15 человека, при его концентрации равной или приблизительно равной 100 МЕ/мл.

[0256] В конкретных вариантах осуществления изобретения, клетки, например клетки входной композиции, инкубируют при стимулирующих условиях в присутствии IL-2, IL-7 и/или IL-15, например, в бессывороточной среде. В некоторых вариантах IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются рекомбинантными. В некоторых вариантах IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются человеческими. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный IL-2, IL-7 и/или IL-15 человека. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют при стимулирующих условиях в присутствии рекомбинантных IL-2, IL-7 и IL-15, например, в бессывороточной среде.

[0257] Условия могут включать одно или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, агентов, таких как питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры связывания, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток.

[0258] В некоторых аспектах инкубирование проводят в соответствии с методиками, описанными в патенте США US 6040177 (Riddell et al.) и в публикациях 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.

[0259] В некоторых вариантах осуществления изобретения инкубирование проводят в бессывороточных средах. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда представляет собой известную и/или хорошо известную среду для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда представляет собой среду с контролируемыми показателями, которая была обработана, например, отфильтрована для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах бессывороточная среда содержит белки. В некоторых вариантах бессывороточные среды могут содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы присоединения.

[0260] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере часть стадии инкубирования в присутствии одного или нескольких стимулирующих условий

или стимулирующего реагента проводят во внутренней полости центрифужной камеры, например, при центробежном вращении, как описано в международной публикации WO 2016/073602. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть стадии инкубирования, выполняемой в центрифужной камере, включает смешивание с реагентом или реагентами для индуцирования стимуляции и/или активации. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, такие как отобранные клетки, смешивают со стимулирующим веществом или стимулирующим агентом в центрифужной камере. В некоторых аспектах таких процессов определенный объем клеток смешивают с определенным количеством одного или нескольких стимулирующих веществ или агентов, где такое количество существенно меньше, чем количество, которое обычно используют при осуществлении аналогичных стимуляций в емкостях для культивирования клеток или в другой системе.

[0261] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий агент добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое значительно меньше (например, не более 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80%) количества, по сравнению с количеством стимулирующего агента, которое обычно используют, или которое должно быть необходимо для достижения такой же или подобной эффективности отбора такого же количества клеток или такого же объема клеток, когда выбор осуществляется без смешивания в камере центрифуги, как в настоящем изобретении, например, в трубе или мешке с периодическим встряхиванием или вращением. В некоторых вариантах осуществления инкубирование осуществляют с добавлением инкубационного буфера к клеткам и стимулирующему агенту для достижения целевого объема при инкубировании реагента, например, в количестве от 10 мл до 200 мл, например, в количестве, равном по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно равном 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 150 мл или 200 мл. В некоторых вариантах осуществления инкубационный буфер и стимулирующий агент предварительно смешивают перед добавлением к клеткам. В некоторых вариантах осуществления инкубационный буфер и стимулирующий агент добавляют по отдельности к клеткам. В некоторых вариантах стимулирующее инкубирование проводят при периодическом слабом перешивании, что может способствовать усилению энергетически благоприятных взаимодействий, обеспечивая, тем самым, использование меньшего количества стимулирующего агента для достижения стимулирования и активации клеток.

[0262] В некоторых вариантах осуществления изобретения инкубирование обычно проводят в условиях перемешивания, таких как при вращательном перемешивании, обычно при относительно низкой силе или скорости, где скорость ниже, чем скорость, используемая для осаждения клеток, например, от или от приблизительно 600 об/мин до или приблизительно до 1700 об/мин (например, от или приблизительно от, или по меньшей мере 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин или 1700 об/мин), например, при RCF в образце или у стенки камеры или другой емкости, от или приблизительно от 80 г до

100 г (например, при, приблизительно при или по меньшей мере от 80 г, 85 г, 90 г, 95 г или 100 г). В некоторых вариантах осуществления вращение выполняют с использованием повторяющихся периодов вращения при низкой скорости с последующим периодом покоя, такими как вращение и/или покой в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, как вращение в течение приблизительно 1 или 2 секунды с последующим периодом покоя приблизительно в течение 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0263] В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность инкубирования в условиях стимуляции, например, с использованием стимулирующих реагентов, находится в интервале, составляющем или приблизительно составляющем от 1 часа до 96 часов, от 1 часа до 72 часов, от 1 часа до 48 часов, от 4 часов до 36 часов, от 8 часов до 30 часов, от 12 часов до 24 часов, от 18 часов до 30 часов, например по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов или 72 часов. В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность инкубирования, например, с использованием стимулирующих реагентов, составляет от приблизительно 18 часов до приблизительно 30 часов.

[0264] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки культивируют и/или инкубируют в условиях стимуляции до и/или во время стадии введения в клетки полинуклеотида, например полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, например, путем трансдукции и/или трансфекции, как описано в Разделе I-C. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют и/или инкубируют при стимулирующих условиях в течение периода времени, составляющего от 30 минут до 2 часов, от 1 часа до 8 часов, от 6 часов до 12 часов, от 12 часов до 18 часов, от 16 часов до 24 часов, от 18 часов до 30 часов, от 24 часов до 48 часов, от 24 часов до 72 часов, от 42 часов до 54 часов, от 60 часов до 120 часов от 96 часов до 120 часов, от 1 до 7 дней, от 3 до 8 дней, от 1 до 3 дней, от 4 до 6 дней или от 4 до 5 дней, до стадии конструирования клеток методами генетической инженерии. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют при стимулирующих условиях в течение или приблизительно в течение от 18 часов до 30 часов. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют при стимулирующих условиях в течение или приблизительно в течение 24 часов.

[0265] В некоторых вариантах осуществления изобретения инкубирование клеток в условиях стимуляции включает инкубирование клеток со стимулирующим реагентом, который описан в Разделе I-B-1. в некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит или включает шарик, такой как парамагнитный шарик, и клетки инкубируют со стимулирующим реагентом в соотношении менее чем 3:1 (шарики:клетки), например, при соотношении 1:1. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют со стимулирующим реагентом в присутствии одного или нескольких цитокинов. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют со стимулирующим реагентом в соотношении 1:1 (шарики : клетки) в присутствии рекомбинантного IL-2, IL-7 и IL-15.

[0266] В конкретных вариантах осуществления изобретения входную композицию клеток, содержащую CD4+ и CD8+ Т-клетки, инкубируют в условиях стимуляции. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют в бессывороточной среде. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения входная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток равное или приблизительно равное 1:1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 100×10^6 клеток, например клеток входной композиции, инкубируют в условиях стимуляции, например, при плотности менее или приблизительно менее 5×10^6 клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 50×10^6 CD4+ Т-клеток и по меньшей мере или приблизительно меньшей мере 50×10^6 CD8+ Т-клеток инкубируют при стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют в течение времени от 18 часов до 30 часов. В конкретных вариантах осуществления инкубирование клеток в условиях стимуляции включает инкубирование клеток со стимулирующим реагентом в присутствии IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых вариантах клетки инкубируют со стимулирующим реагентом в соотношении менее чем 3:1 (стимулирующий реагент : клетки). В некоторых вариантах клетки инкубируют с IL-2 в количестве от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл, с IL-7 в количестве от или приблизительно от 400 МЕ/мл до или приблизительно до 1000 МЕ/мл и/или с IL-15 в количестве от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл.

[0267] В некоторых вариантах осуществления изобретения входную композицию, содержащую от 100×10^6 до 500×10^6 CD4+ и CD8+ Т-клеток в соотношении равном или приблизительно равном 1:1, инкубируют в стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления клетки являются жизнеспособными клетками и/или являются негативными в отношении маркеру апоптоза. В некоторых вариантах инкубируют входную композицию, содержащую по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 300×10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют в бессывороточной среде. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют при плотности равной или приблизительно равной 3×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах инкубируют по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 150×10^6 CD4+ Т-клеток и по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 150×10^6 CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления клетки инкубируют со стимулирующим реагентом в соотношении равном или приблизительно равном 1:1 (стимулирующий реагент:клетки). В некоторых вариантах клетки инкубируют в присутствии IL-2 в количестве, равном или приблизительно равном 100 МЕ/мл, или в присутствии IL-7 в количестве, равном или приблизительно равном 600 МЕ/мл IL-7, и в присутствии IL-15 в количестве равном или приблизительно равном 200 МЕ/мл.

1 Стимулирующие реагенты

[0268] В некоторых вариантах осуществления изобретения инкубирование композиции обогащенных клеток в условиях стимуляции представляет собой или

включает инкубирование и/или контактирование композиции обогащенных клеток со стимулирующим реагентом, способным активировать и/или размножать Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент способен стимулировать и/или активировать один или несколько сигналов в клетках. В некоторых вариантах осуществления один или несколько сигналов опосредованы рецептором. В конкретных вариантах один или несколько сигналов связаны с изменением сигнальной трансдукции и/или уровнем или количеством вторичных мессенджеров, например cAMP и/или внутриклеточного кальция, с изменением количества, клеточной локализации, конфирмации, фосфорилирования, убиквитинирования и/или укорочения одного или нескольких клеточных белков и/или с изменением клеточной активности, например, транскрипции, трансляции, деградации белка, с клеточной морфологией, состоянием активации и/или деления клеток. В конкретных вариантах условия стимуляции включают инкубирование и/или культивирование клеток с использованием стимулирующего реагента. В некоторых вариантах стимулирующий реагент содержит или включает шарики. В некоторых вариантах осуществления инициирование стимуляции происходит, когда клетки инкубируют или приводят в контакт со стимулирующим реагентом. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит или включает олигомерный реагент, например, олигомерный мутеин стрептавидина. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент активирует и/или способен активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул.

[0269] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующие условия или использование стимулирующих реагентов включают использование одного или нескольких агентов, например лиганда, который способен активировать внутриклеточный сигнальный домен TCR-комплекса. В некоторых вариантах осуществления агент, как описано здесь, может включать, без ограничения, РНК, ДНК, белки (например, ферменты), антигены, поликлональные антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител, углеводы, липиды, лектины или любые другие биомолекулы со сродством к желаемой мишени. В некоторых вариантах осуществления мишенью является Т-клеточный рецептор и/или компонент Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах мишенью является CD3. В определенном варианте осуществления мишенью является костимуляторная молекула Т-клеток, например, CD28, CD137 (4-1BB), OX40 или ICOS. Один или несколько агентов могут быть непосредственно или опосредованно присоединены к шарику различными способами, известными в данной области техники. Присоединение может быть ковалентным, нековалентным, электростатическим или гидрофобным, и оно может быть осуществлено различными средствами присоединения, включая, например, химические средства, механические средства или ферментативные средства. В некоторых вариантах осуществления агентом является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab. В некоторых

вариантах осуществления биомолекула (например, биотинилированное анти-CD3-антитело) может быть присоединено опосредованно к шарику через другую биомолекулу (например, через анти-биотиновое антитело), которая непосредственно присоединено к шарикук.

[0270] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент содержит один или несколько агентов (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab), который специфически связывается с одной или несколькими из следующих макромолекул на клетке (например, Т-клетке): CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-l), CD127, MHCI, MHCII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27l (CD70) 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R, IFN-гамма R, TNF-альфа, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1), CD62L (L-селектин), CD29/CD49d (VLA-4), лиганд Notch (например, дельта-подобный 1/4, Jagged 1/2 и др.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 и CXCR3, или их фрагменты, включая соответствующие лиганды для этих макромолекул или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит один или несколько агентов (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab), который специфически связывается с одной или несколькими из следующих макромолекул на клетке (например, Т-клетке): CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO. В некоторых вариантах один или несколько агентов могут быть присоединены к шарику (например, парамагнитному шарику). В некоторых вариантах один или несколько агентов могут быть присоединены (например, обратимо присоединены) к олигомерному реактиву, например, олигомеру мутеина стрептавидина.

[0271] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько агентов включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab. Антитело может включать поликлональное антитело, моноклональное антитело (включая полноразмерные антитела, которые имеют Fc-область иммуноглобулина), композиции антител с полиэпитопной специфичностью, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, диатела и одноцепочечные молекулы, а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')2 и Fv). В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент представляет собой или содержит фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), например фрагмент Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')2. Очевидно, что для рассматриваемых здесь антител могут быть использованы константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области могут быть получены от любых видов животных (например, от грызунов) или от человека. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой или содержит антитело, которое связывается и/или распознает один или несколько компонентов Т-клеточного рецептора. В конкретных вариантах осуществления агент представляет собой или содержит анти-CD3-антитело. В некоторых вариантах агент представляет собой или содержит антитело, которое связывается и/или распознает

корецептор. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент представляет собой или содержит анти-CD28-антитело.

[0272] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, например, клетки входной популяции, стимулируют в присутствии стимулирующего реагента в соотношении реагент:клетки равном или приблизительно равном 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,5:1, 1,25:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,75:1, 0,67:1, 0,5:1, 0,3:1 или 0,2:1. В конкретных вариантах осуществления соотношение стимулирующего реагента и клеток равно от 2,5: 1 до 0,2:1, от 2:1 до 0,5:1, от 1,5:1 до 0,75:1, от 1,25:1 до 0,8:1, от 1,1:1 и 0,9:1. В конкретных вариантах соотношение стимулирующего реагента и клеток равно 1:1 или приблизительно равно 1:1.

[0273] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки стимулируют в присутствии стимулирующего реагента в количестве, равном, приблизительно равном или по меньшей мере 0,01 мкг, 0,02 мкг, 0,03 мкг, 0,04 мкг, 0,05 мкг, 0,1 мкг, 0,2 мкг, 0,3 мкг, 0,4 мкг, 0,5 мкг, 0,75 мкг, 1 мкг, 2 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг, 6 мкг, 7 мкг, 8 мкг, 9 мкг или 10 мкг, на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки стимулируют в присутствии или приблизительно 4 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления клетки стимулируют в присутствии стимулирующего реагента в количестве равном или приблизительно равном 0,8 мкг на 10^6 клеток. В различных других вариантах осуществления клетки стимулируют в присутствии стимулирующего реагента в количестве равном или приблизительно равном 0,8 мкг на 10^6 клеток.

a. *Частицы/шарики*

[0274] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент содержит частицу, например шарик, где частица конъюгирована или связана с одним или несколькими агентами, например биомолекулами, которые способны активировать и/или размножать клетки, например Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления один или несколько агентов связаны с шариком. В некоторых вариантах частицы являются биосовместимыми, т.е. они состоит из материала, который пригоден для биологического применения. В некоторых вариантах осуществления частицы являются нетоксичными для культивируемых клеток, например культивируемых Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления частицы могут представлять собой любые частицы, которые способны к присоединению агентов таким образом, чтобы обеспечить взаимодействие между агентом и клеткой.

[0275] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент содержит один или несколько агентов, способных активировать и/или размножать клетки, например Т-клетки, где агент/агенты связаны или иным образом присоединены к частице, например к поверхности шарика. В некоторых вариантах осуществления изобретения частица представляет собой неклеточную частицу. В конкретных вариантах осуществления изобретения частица может включать коллоидную частицу, микросферу, наночастицу, магнитный шарик или тому подобное. В некоторых вариантах

осуществления частицы представляют собой частицы агарозы. В некоторых вариантах осуществления шарики представляют собой сефарозные шарики.

[0276] В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит шарики, которые представляют собой монодисперсные шарики. В некоторых вариантах шарики, которые являются монодисперсными, имеют отклонения в размерах, при стандартном отклонении диаметра шариков, составляющим менее 5%.

[0277] В некоторых вариантах осуществления изобретения частица содержит один или несколько агентов, таких как агент, который связан, конъюгирован или присоединен (непосредственно или опосредованно) к поверхности частицы. В некоторых вариантах осуществления агент, как описано здесь, может включать, без ограничения, РНК, ДНК, белки (например, ферменты), антигены, поликлональные антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител, углеводы, липиды, лектины или любые другие биомолекулы со сродством к желаемой мишени. В некоторых вариантах осуществления мишенью является Т-клеточный рецептор и/или компонент Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления мишенью является CD3. В определенном варианте осуществления изобретения мишенью является костимуляторная молекула Т-клеток, например, CD28, CD137 (4-1BB), OX40 или ICOS. Один или несколько агентов могут быть присоединены непосредственно или опосредованно к шарику различными способами, известными и используемыми в данной области техники. Присоединение может быть ковалентным, нековалентным, электростатическим или гидрофобным и может быть осуществлено различными средствами присоединения, включая, например, химические средства, механические средства или ферментативные средства. В некоторых вариантах биомолекула (например, биотинилированное анти-CD3-антитело) может быть присоединена опосредованно к шарику через другую биомолекулу (например, через анти-биотиновое антитело), которая непосредственно присоединена к шарику.

[0278] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент содержит шарик и один или несколько агентов, которые непосредственно взаимодействуют с макромолекулой на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения частица (например, парамагнитный шарик) взаимодействует с клеткой через один или несколько агентов (например, антитело), специфических для одной или нескольких макромолекул на клетке (например, для одного или нескольких белков клеточной поверхности). В некоторых вариантах осуществления изобретения шарик (например, парамагнитный шарик) метят первым агентом, описанным здесь, таким как первичное антитело (например, антитело против биотина) или другой биомолекулой, а затем вторым агентом, таким как вторичное антитело (например, биотинилированное анти-CD3-антитело) или другой второй биомолекулой (например, стрептавидином), посредством чего вторичное антитело или другая вторая биомолекула специфически связывается с такими первичными антителами или другой биомолекулой на частице.

[0279] В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит один или несколько агентов (например, антител) которые присоединены к шарику

(например, к парамагнитному шарику) и специфически связываются с одной или несколькими из макромолекулами на клетке (например, Т-клетке) из числа следующих: CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-l), CD127, MHCI, MHCII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27l (CD70) 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R, IFN-гамма R, TNF-альфа, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1), CD62L (L-селектин), CD29/CD49d (VLA-4), лиганд Notch (например, дельта-подобный 1/4, Jagged 1/2 и др.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 и CXCR3, или их фрагменты, включая соответствующие лиганды для этих макромолекул или их фрагментов. В некоторых вариантах агент (например, антитело), присоединенный к шарику, специфически связывается с одной или несколькими из следующих макромолекул на клетке (например, Т-клетке): CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO.

[0280] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько агентов, присоединенных к шарику, представляют собой антитело. Антитело может включать поликлональное антитело, моноклональное антитело (включая полноразмерные антитела, которые имеют Fc-область иммуноглобулина), композиции антител с полиэпитопной специфичностью, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, диатела и одноцепочечные молекулы, а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')2 и Fv). В некоторых вариантах осуществления стимулирующим реагентом является фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), например фрагмент Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')2. Очевидно, что для описанных здесь антител могут быть использованы константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области могут быть получены от любых видов животных (например, грызунов) или от человека. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой антитело, которое связывается и/или распознает один или несколько компонентов Т-клеточного рецептора. В конкретных вариантах осуществления агентом является анти-CD3-антитело. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой антитело, которое связывается и/или распознает корецептор. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит анти-CD28-антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарик имеет диаметр более или приблизительно боле 0,001 мкм, более или приблизительно более 0,01, более или приблизительно более 0,1 мкм, более или приблизительно более 1,0 мкм, более или приблизительно более 10 мкм, более или приблизительно более 50 мкм, более или приблизительно более 100 мкм, или более или приблизительно более 1000 мкм, и не более или приблизительно не более 1500 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарик имеет диаметр от или приблизительно от 1,0 мкм до или приблизительно до 500 мкм, от или приблизительно от 1,0 мкм до или приблизительно до 150 мкм, от или приблизительно от 1,0 мкм до или приблизительно до 30 мкм, от или приблизительно от 1,0 мкм до или приблизительно до 10 мкм, от или приблизительно от 1,0 мкм до или приблизительно до 5,0 мкм от или

приблизительно от 2,0 мкм до или приблизительно до 5,0 мкм, или от или приблизительно от 3,0 мкм до или приблизительно до 5,0 мкм. В некоторых вариантах осуществления шарик имеет диаметр от или приблизительно от 3 мкм до или приблизительно до 5 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарик имеет диаметр по меньшей мере равный или по меньшей мере приблизительно равный, или приблизительно равный 0,001 мкм, 0,01 мкм, 0,1 мкм, 0,5 мкм, 1,0 мкм, 1,5 мкм, 2,0 мкм, 2,5 мкм, 3,0 мкм, 3,5 мкм, 4,0 мкм, 4,5 мкм, 5,0 мкм, 5,5 мкм, 6,0 мкм, 6,5 мкм, 7,0 мкм, 7,5 мкм, 8,0 мкм, 8,5 мкм, 9,0 мкм, 9,5 мкм, 10 мкм, 12 мкм, 14 мкм, 16 мкм, 18 мкм или 20 мкм. В некоторых вариантах шарики имеет диаметр равный или приблизительно равный 4,5 мкм. В некоторых вариантах осуществления частицы имеет диаметр равный или приблизительно равный 2,8 мкм.

[0281] В некоторых вариантах осуществления изобретения, шарики имеют плотность более или приблизительно более 0,001 г/см^3, более или приблизительно более 0,01 г/см^3, более или приблизительно более 0,05 г/см^3, более или приблизительно более 0,1 г/см^3, более или приблизительно более 0,5 г/см^3, более или приблизительно более 0,6 г/см^3, более или приблизительно более 0,7 г/см^3, более или приблизительно более 0,8 г/см^3, более или приблизительно более 0,9 г/см^3, более или приблизительно более 01 г/см^3, более или приблизительно более 1,1 г/см^3, более или приблизительно более 1,2 г/см^3, более или приблизительно более 1,3 г/см^3, более или приблизительно более 1,4 г/см^3, более или приблизительно более 1,5 г/см^3, более или приблизительно более 2 г/см^3, более или приблизительно более 3 г/см^3, более или приблизительно более 4 г/см^3, или более или приблизительно более 5 г/см^3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, шарики имеют плотность от или приблизительно от 0,001 г/см^3 до или приблизительно до 100 г/см^3, от или приблизительно от 0,01 г/см^3 до или приблизительно до 50 г/см^3, от или приблизительно от 0,1 г/см^3 до или приблизительно до 10г/см^3, от или приблизительно от 0,1 г/см^3 до или приблизительно до 5 г/см^3, от или приблизительно от 0,5 г/см^3 до или приблизительно до 1 г/см^3, от или приблизительно от 0,5 г/см^3 до или приблизительно до 1,5 г/см^3, от или приблизительно от 1 г/см^3 до или приблизительно до 1,5 г/см^3, от или приблизительно от 1 г/см^3 до или приблизительно до 2 г/см^3, от или приблизительно от 1 г/см^3 до или приблизительно до 5 г/см^3. В некоторых вариантах осуществления шарики имеют плотность равную или приблизительно равную 0,5 г/см^3, равную или приблизительно равную 0,6 г/см^3, равную или приблизительно равную 0,7 г/см^3, равную или приблизительно равную 0,8 г/см^3, равную или приблизительно равную 0,9 г/см^3, равную или приблизительно равную 1,0 г/см^3, равную или приблизительно равную 1,1 г/см^3, равную или приблизительно равную 1,2 г/см^3 равную или приблизительно равную 1,3 г/см^3, равную или приблизительно равную 1,4 г/см^3, равную или приблизительно равную 1,5 г/см^3, равную или приблизительно равную 1,6 г/см^3, равную или приблизительно равную 1,7 г/см^3, равную или приблизительно равную 1,8 г/см^3, равную или приблизительно равную 1,9 г/см^3 или равную или приблизительно равную 2,0 г/см^3. В некоторых вариантах осуществления частицы имеют плотность равную или

приблизительно равную 1,6 г/см^3, В конкретных вариантах осуществления частицы или частицы имеют плотность равную или приблизительно равную 1,5 г/см^3. В некоторых вариантах осуществления частицы имеют плотность, равную или приблизительно 1,3 г/см^3.

[0282] В некоторых вариантах осуществления изобретения множество шариков имеет однородную плотность. В некоторых вариантах осуществления однородная плотность характеризуется стандартным отклонением плотности менее или приблизительно менее 10%, менее или приблизительно менее 5% или менее или приблизительно менее 1% от средней плотности гранул.

[0283] В некоторых вариантах осуществления изобретения шарики имеют площадь поверхности от или приблизительно от 0,001 м^2 на грамм частиц (м^2/г) до или приблизительно до 1000 м^2/г, от или приблизительно от 0,010 м^2/г до или приблизительно до 100 м^2/г, от или приблизительно от 0,1 м^2/г до или приблизительно до 10 м^2/г, от или приблизительно от 0,1 м^2/г до или приблизительно до 1 м^2/г, или от или приблизительно от 1 м^2/г до или приблизительно до 10 м^2/г, от или приблизительно от 10 м^2/г до или приблизительно до 100 м^2/г, или от или приблизительно от 0,5 м^2/г до или приблизительно до 20 м^2/г, от или приблизительно от 0,5 м^2/г до или приблизительно до 5 м^2/г, или от или приблизительно от 1 м^2/г до или приблизительно до 4 м^2/г. В некоторых вариантах осуществления частицы или шарики имеют площадь поверхности от или приблизительно от 1 м^2/г до или приблизительно до 4 м^2/г.

[0284] В некоторых вариантах осуществления шарики содержит по меньшей мере один материал на поверхности или вблизи поверхности шарика, который может быть соединен, связан или конъюгирован с агентом. В некоторых вариантах осуществления поверхность шарика функционализирована, то есть она содержит функциональные группы, которые способны образовывать ковалентную связь с молекулой связывания, например с полинуклеотидом или полипептидом. В конкретных вариантах осуществления изобретения шарик содержит на своей поверхности карбоксильные, амино, гидроксильные, тозильные, эпокси и/или хлорметильные группы. В конкретных вариантах осуществления частицы содержат на поверхности агарозу и/или сефарозу. В некоторых вариантах поверхность частицы содержит присоединенные стимулирующие реагенты, которые могут связывать или присоединять связывающие молекулы. В конкретных вариантах биомолекулы представляют собой полипептиды. В некоторых вариантах частицы содержат на поверхности белок A, белок G или биотин.

[0285] В некоторых вариантах осуществления изобретения шарики действуют в магнитном поле. В некоторых вариантах осуществления шарики представляет собой магнитные шарики. В некоторых вариантах осуществления магнитный шарик является парамагнитным. В конкретных вариантах осуществления изобретения магнитный шарик является суперпарамагнитным. В некоторых вариантах осуществления шарики не проявляют каких-либо магнитных свойств, если они не подвергаются воздействию магнитного поля.

[0286] В конкретных вариантах осуществления изобретения шарики содержат магнитное ядро, парамагнитное ядро или суперпарамагнитное ядро. В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро содержит металл. В некоторых вариантах осуществления металл может представлять собой, без ограничения, железо, никель, медь, кобальт, гадолиний, марганец, тантал, цинк, цирконий или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро содержит оксиды металлов (например, оксиды железа), ферриты (например, ферриты марганца, ферриты кобальта, ферриты никеля и т.п.), гематит и сплавы металлов (например, CoTaZn). В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро содержит одно или несколько из феррита, металла, металлического сплава, оксида железа или диоксида хрома. В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро содержит элементарное железо или его соединение. В некоторых вариантах осуществления магнитное ядро содержит одно или несколько из магнетита (Fe_3O_4), маггемита (γFe_2O_3) или грейгита (Fe_3S_4). В некоторых вариантах осуществления внутреннее ядро содержит оксид железа (например, Fe_3O_4).

[0287] В некоторых вариантах осуществления изобретения шарики содержат магнитное, парамагнитное и/или суперпарамагнитное ядро, которое имеет покрытие или функционализированное покрытие. В некоторых вариантах осуществления покрытие может содержать материал, который может включать, без ограничения полимер, полисахарид, диоксид кремния, жирную кислоту, белок, углерод, агарозу, сефарозу или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления полимер может представлять собой полиэтиленгликоль, поли(молочная-ко-гликолевая кислота), полиглутаральдегид, полиуретан, полистирол или поливиниловый спирт. В некоторых вариантах внешнее покрытие или покрытие содержит полистирол. В конкретных вариантах осуществления внешнее покрытие является поверхностно функционализированным.

[0288] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент включает шарик, который содержит ядро из оксида металла (например, ядро из оксида железа) и покрытие, где ядро из оксида металла содержит по меньшей мере один полисахарид (например, декстран), и где покрытие содержит по меньшей мере один полисахарид (например, аминодекстран), по меньшей мере один полимер (например, полиуретан) и диоксид кремния. В некоторых вариантах ядро из оксида металла представляет собой ядро из коллоидного оксида железа. В некоторых вариантах осуществления один или несколько агентов включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах один или несколько агентов включают анти-CD3-антитело и анти-CD28-антитело. В некоторых вариантах стимулирующий реагент содержит анти-CD3-антитело, анти-CD28-антитело и анти-биотиновое антитело. В некоторых вариантах стимулирующий реагент содержит анти-биотиновое антитело. В некоторых вариантах изобретения шарик имеет диаметр от приблизительно 3 мкм до приблизительно 10 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарик имеет диаметр от приблизительно 3 мкм до приблизительно 5 мкм. В некоторых вариантах осуществления шарик имеет диаметр приблизительно 3,5 мкм.

[0289] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент содержит один или несколько агентов, которые присоединены к шарику, содержащему ядро из оксида металла (например, внутреннее ядро из оксида железа) и покрытие (например, защитное покрытие), где покрытие содержит полистирол. В некоторых вариантах осуществления шарики представляют собой монодисперсные, парамагнитные (например, суперпарамагнитные) шарики, содержащие парамагнитное (например, суперпарамагнитное) железное ядро, например, ядро, содержащее магнетит (Fe_3O_4), и/или маггемит (γFe_2O_3) и полистирольное покрытие. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарик является непористым. В некоторых вариантах осуществления шарики имеют функционализированную поверхность, к которой присоединены один или несколько агентов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько агентов ковалентно связаны с поверхностью шарика. В некоторых вариантах осуществления один или несколько агентов включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления один или несколько агентов включают анти-CD3-антитело и анти-CD28-антитело. В некоторых вариантах осуществления один или несколько агентов включают анти-CD3-антитело и/или анти-CD28-антитело, и антитело или его антигенный фрагмент способны связываться с меченным антителом (например, биотинилированным антителом), таким как меченное анти-CD3-антитело или анти-CD28-антитело. В некоторых вариантах осуществления шарики имеют плотность приблизительно 1,5 г/см^3 и площадь поверхности от приблизительно 1 м^2/г до приблизительно 4 м^2/г. В конкретных вариантах осуществления шарики представляют собой монодисперсные суперпарамагнитные шарики, которые имеют диаметр приблизительно 4,5 мкм и плотность приблизительно 1,5 г/см^3. В некоторых вариантах осуществления шарики являются монодисперсными суперпарамагнитными шариками, имеющими средний диаметр приблизительно 2,8 мкм и плотность приблизительно 1,3 г/см^3.

[0290] В некоторых вариантах осуществления изобретения, композицию обогащенных Т-клеток инкубируют со стимулирующим реагентом при соотношении шариков и клеток, составляющим или приблизительно равным 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,5:1, 1,25:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,75:1, 0,67:1, 0,5:1, 0,3:1 или 0,2:1. В конкретных вариантах соотношение шариков и клеток находится в пределах от 2,5:1 до 0,2:1, от 2:1 до 0,5:1, от 1,5:1 до 0,75:1, от 1,25:1 до 0,8:1, от 1,1:1 до 0,9:1. В конкретных вариантах осуществления изобретения соотношение шариков и клеток составляет 1:1 или приблизительно равно 1:1.

b Олигомерные реагенты

[0291] В конкретных вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент содержит олигомерный реагент, например, мутеин стрептавидина, который конъюгирован, связан или присоединен к одному или нескольким агентам, например лиганду, который способен активировать внутриклеточный сигнальный домен комплекса TCR. В некоторых вариантах осуществления один или несколько агентов имеют присоединенный связывающий домен или партнер связывания (например, партнер

связывания C), который способен связываться с олигомерным реагентом в конкретных сайтах связывания (например, в сайте связывания Z). В некоторых вариантах осуществления множество агентов обратимо связаны с олигомерным реагентом. В различных вариантах осуществления олигомерный реагент имеет множество конкретных сайтов связывания, которые в некоторых вариантах осуществления обратимо связаны с множеством агентов в домене связывания (например, в партнере связывания C). В некоторых вариантах осуществления количество связанных агентов снижено или уменьшено в присутствии конкурентного реагента, например реагента, который также способен связываться с конкретными сайтами связывания (например, сайтом связывания Z). Олигомерные стимулирующие реагенты, включая анти-CD3/анти-CD28-олигомерный мутеин стрептавидина, описаны в международной публикации PCT WO 2018/197949.

[0292] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент представляет собой или включает обратимые системы, в которых по меньшей мере один агент (например, агент, способный продуцировать сигнал в клетке, в такой как Т-клетке), ассоциирован, например, обратимо связан, с олигомерным реагентом. В некоторых вариантах осуществления изобретения реагент содержит множество сайтов связывания, способных связываться, например, обратимо связываться, с агентом. В некоторых случаях реагент представляет собой олигомерный реагент в виде частиц, имеющий по меньшей мере один присоединенный агент, способный продуцировать сигнал в клетке, такой как Т-клетка. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент содержит по меньшей мере один сайт связывания, например, сайт связывания B, который может специфически связывать эпитоп или область молекулы, а также содержит партнер связывания, также упоминаемый здесь как партнер связывания C, который специфически связывается по меньшей мере с одним сайтом связывания реагента, например с сайтом связывания Z реагента. В некоторых вариантах связывания между партнером связывания C и с по меньшей мере одним сайтом связывания Z представляет собой нековалентное взаимодействие/связывание. В некоторых случаях взаимодействие/связывание между партнером связывания C и по меньшей мере с одним сайтом связывания Z представляет собой ковалентное взаимодействие/связывание. В некоторых вариантах взаимодействие/связывание, такое как нековалентное взаимодействие/связывание между партнером связывания C и с по меньшей мере одним сайтом связывания Z, является обратимым.

[0293] Вещества, которые могут быть использованы в качестве олигомерных реагентов в таких обратимых системах, известны: см. например, патенты США US 5168049; US 5506121; US 6103493; US 7767562; US 7981632; US 8298782; US 8735540; US 9023604; и международные заявки PCT WO 2013/124474 и WO 2014/076277. Неограничивающими примеры реагентов и партнеров связывания, способные обратимое взаимодействовать/связываться, а также веществ, способных изменить такое связывание (например, конкурентных реагентов), описаны ниже.

[0294] В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерный реагент представляет собой олигомер стрептавидина, мутеина или аналог стрептавидина, авидина, мутеина или аналог авидина (такой как нейтравидин) или их смеси, где такой олигомерный реагент содержит один или несколько сайтов связывания для обратимой ассоциации с доменом связывания агента (например, партнера связыванию C). В некоторых вариантах осуществления связывающим доменом агента может быть биотин, производное или аналог биотина или стрептавидин-связывающий пептид или другая молекула, которая способна специфически связываться со стрептавидином, мутеином или аналогом стрептавидина, авидином, или мутеином или аналогом авидина.

[0295] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько агентов (например, агентов, которые способны продуцировать сигнал в клетке, в такой как Т-клетке), ассоциированы, например, обратимо связаны, с олигомерным реагентом, например, через множество конкретных сайтов связывания (например, сайтов связывания Z), присутствующих на олигомерном реагенте. В некоторых случаях это приводит к тому, что агенты расположены близко друг к другу, и в этом случае может иметь место авидность, если целевая клетка имеет на клеточной поверхности молекулу (по меньшей мере, две ее копии), которая связывается или распознается агентом, при приведении ее в контакт с агентом.

[0296] В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерный реагент представляет собой олигомер стрептавидина, олигомер мутеина стрептавидина, олигомер аналога стрептавидина, олигомер авидина, олигомер, состоящий из мутеина авидина или аналога авидина (такого как нейтравидин) или их смеси. В конкретных вариантах осуществления изобретения олигомерные реагенты содержат конкретные сайты связывания, которые способны связываться со связывающим доменом агента (например, связывающим партнером C). В некоторых вариантах осуществления связывающим доменом может быть биотин, производное или аналог биотина или стрептавидин-связывающий пептид или другая молекула, которая способна специфически связываться со стрептавидином, мутеином или аналогом стрептавидина, авидином, или мутеином или аналогом авидина.

[0297] В некоторых вариантах осуществления стрептавидин может представлять собой стрептавидин дикого типа, мутеины или аналоги стрептавидина, такие как стрептавидин-подобные полипептиды. Аналогично, в некоторых аспектах, авидин включает авидин дикого типа или мутеины или аналоги авидина, такие как нейтравидин, дегликозилированный авидин с модифицированными аргининами, которые обычно имеют более нейтральный pI, и доступны в качестве альтернативы нативному авидину. Как правило, дегликозилированные, нейтральные формы авидина включают коммерчески доступные формы, такие как, например, интровидин, доступный от Sigma Aldrich, или, например, нейтравидин, доступный от Thermo Scientific или Invitrogen.

[0298] В некоторых вариантах осуществления изобретения реагент представляет собой стрептавидин или мутеин или аналог стрептавидина. В некоторых вариантах

осуществления стрептавидин дикого типа (wt-стрептавидин) имеет аминокислотную последовательность, раскрытую в Argarana et al. Nucleic Acids Res 14 (1986) 1871-1882 (SEQ ID NO: 72). Обычно стрептавидин представлен в виде тетрамера из четырех идентичных субъединиц, то есть он представляет собой гомо-тетрамер, где каждая субъединица содержит один сайт связывания для биотина, производного биотина, или аналога или миметика биотина. Примерная последовательность субъединицы стрептавидина представляет собой последовательность аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 72, но такая последовательность может также включать последовательность, присутствующую в гомологах стрептавидина из других видов Streptomyces. В частности, каждая субъединица стрептавидина может проявлять сильную связывающую аффинность для биотина с равновесной константой диссоциации (KD) с порядком, приблизительно соответствующим 10^{-14} М. В некоторых случаях стрептавидин может быть в виде одновалентного тетрамера, в котором функциональным является только один из четырех сайтов связывания (Howarth et al. (2006) Nat. Methods, 3:267-73; Zhang et al. (2015) Biochem. Biophys. Res. Commun., 463:1059-63)), двухвалентного тетрамера, в котором два из четырех сайтов связывания являются функциональными (Fairhead et al. (2013) J Mol. Biol. 426:199-214), или он может присутствовать в мономерной или димерной форме (Wu et al. (2005) J Biol. Chem. 280:23225-31; Lim et al. (2010) Biochemistry, 50:8682-91).

[0299] В некоторых вариантах осуществления изобретения стрептавидин может находиться в любой форме, например в виде стрептавидина дикого типа или немодифицированного стрептавидина, как стрептавидин из вида Streptomyces, или представлять собой функционально активный фрагмент, который включает по меньшей мере одну функциональную субъединицу, содержащую сайт связывания для биотина, производного биотина или аналога биотина, и такой стрептавидин, как правило, содержит по меньшей мере одну функциональную субъединицу стрептавидина дикого типа из Streptomyces avidini, представленную в SEQ ID NO: 72, или его функционально активный фрагмент. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения стрептавидин может включать фрагмент стрептавидина дикого типа, который укорочен на N- и/или C-конце. Такие минимальные стрептавидины включают любые, которые начинаются с N-конца в области аминокислотных положений от 10 до 16 SEQ ID NO: 72, и заканчиваются на C-конце в области аминокислотных положений 133-142 SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления функционально активный фрагмент стрептавидина содержит последовательность аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления стрептавидин, такой как описанный последовательностью SEQ ID NO: 73, может дополнительно содержать N-концевой метионин в положении, соответствующем Alal3, с нумерацией, представленной в SEQ ID NO: 72. Указания на положения остатков в стрептавидине или в мутеинах стрептавидина представлены со ссылкой на нумерацию остатков в SEQ ID NO: 72.

[0300] Примеры стрептавидина или мутеинов стрептавидина показаны, например, в WO 86/02077, DE 19641876 A1, US 6022951, WO 98/40396 или WO 96/24601. Примеры

мутеинов стрептавидина известны в данной области, см. например, патенты США US 5168049; US 5506121; US 6022951; US 6156493; US 6165750; US 6103493 или US 6368813; или международную заявку PCT WO 2014/076227.

[0301] В некоторых вариантах осуществления изобретения мутеин стрептавидина может содержать аминокислоты, которые не являются частью немодифицированного стрептавидина или стрептавидина дикого типа, или может включать только часть немодифицированного стрептавидина или стрептавидина дикого типа. В некоторых вариантах мутеин стрептавидина содержит по меньшей мере одну субъединицу, которая может иметь по меньшей мере одну аминокислотную замену (замены) по сравнению с субъединицей немодифицированного стрептавидина или стрептавидина дикого типа стрептавидина, например, по сравнению с субъединицей стрептавидином дикого типа, представленной в SEQ ID NO: 72, или его функционально активного фрагмента, например, представленного в SEQ ID NO: 73 или SEQ ID NO: 94.

[0302] В некоторых вариантах осуществления изобретения аффинность связывания, такая как константа диссоциации (K_d) стрептавидина или мутеина стрептавидина для связывающего домена меньше или приблизительно меньше 1×10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M или 1×10^{-7} M, но обычно больше 1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M или 1×10^{-11} M. Например, пептидные последовательности (Strep-TAG), описанные в патенте США US 5506121, могут действовать как миметики биотина, и они обладают аффинностью связывания со стрептавидином, например, при KD от приблизительно 10^4 M до приблизительно 10^5 M. В некоторых случаях аффинность связывания может быть дополнительно улучшена путем создания мутации в молекуле стрептавидина (см. например, патент США US 6103493 или международную заявку PCT WO 2014/076277). В некоторых вариантах аффинность связывания может быть определена способами, известными в данной области, включая описанные здесь.

[0303] В некоторых вариантах осуществления изобретения реагент, такой как стрептавидин или мутеин стрептавидина, проявляет связывающую аффинность по отношению к пептидному лиганду партнера связывания, причем пептидный лиганд партнера связывания может быть партнером связывания С, присутствующим в агенте (например, в агенте, связывающимся с рецептором, или в агенте для отбора). В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидная последовательность содержит последовательность общей формулы His-Pro-Xaa, где Xaa представляет собой глутамин, аспарагин или метионин, в частности, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидная последовательность имеет общую формулу, представленную в SEQ ID NO: 90, в частности, SEQ ID NO: 80. В одном примере пептидная последовательность представляет собой Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (также называемая Strep-tag®, представленная в SEQ ID NO: 81). В одном примере пептидная последовательность представляет собой Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (также называемая Strep-tag® II, представленная в SEQ ID NO: 75). В некоторых вариантах пептидный лиганд содержит последовательное расположение по меньшей мере

двух модулей, связывающих стрептавидин, где расстояние между этими двумя модулями составляет по меньшей мере 0 но не более 50 аминокислот, где один модуль связывания имеет от 3 до 8 аминокислот и включает по меньшей мере последовательность His-Pro-Xaa, где Xaa представляет собой глутамин, аспарагин или метионин, и где другой модуль связывания имеет такой же или другой лиганд стрептавидинового пептида, такой как описанный в SEQ ID NO: 90 (см. например, международную заявку PCT WO 02/077018; патент США US 7981632). В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный лиганд содержит последовательность, имеющую формулу, представленную в SEQ ID NO: 82 или SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления пептидный лиганд имеет последовательность аминокислот, представленных в любой из SEQ ID NO: 76-78 и 84-85. В большинстве случаев все эти стрептавидин-связывающие пептиды связываются с одним и тем же сайтом связывания, а именно с сайтом связывания биотина в стрептавидине. Если в качестве партнеров связывания C, например C1 и C2, используют один или несколько таких стрептавидин-связывающих пептидов, то мультимеризующий реагент и/или олигомерные частицы, связанные с одним или несколькими агентами через партнер связывания C, обычно состоят из одного или нескольких мутеинов стрептавидина.

[0304] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин стрептавидина содержит по меньшей мере одну мутацию в области положений аминокислот 44-53 аминокислотной последовательности стрептавидина дикого типа, такой как SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина содержит мутацию в одном или нескольких остатках 44, 45, 46 и/или 47. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутеин стрептавидина содержит замену Glu в положении 44 стрептавидина дикого типа на гидрофобную алифатическую аминокислоту, например, на Val, Ala, Ile или Leu, на любую аминокислоту в положении 45, алифатическую аминокислоту, такую как гидрофобная алифатическая аминокислота в положении 46, и/или замену Val в положении 47 на основную аминокислоту, например Arg или Lys, как правило, на Arg. В некоторых вариантах осуществления Ala находится в положении 46 и/или Arg находится в положении 47, и/или Val или Ile находится в положении 44. В некоторых вариантах осуществления мутант стрептавидина содержит остатки Val44-Thr45-Ala46-Arg47, как представлено в примерах мутеинов стрептавидина, содержащих последовательность аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 86, или SEQ ID NO: 87 или SEQ ID NO: 88 (также известную как мутант стрептавидина 1, SAM1). В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина содержит остатки Ile44-Gly45-Ala46-Arg47, как показано в примерах мутеинов стрептавидина, содержащих последовательность аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 74 или SEQ ID NO: 79 (также известную как SAM2). В некоторых случаях такой мутеин стрептавидина описан, например, в патенте США US 6103493, и коммерчески доступен под торговой маркой Strep-Tactin®. В некоторых вариантах мутеин стрептавидина содержит последовательность аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 93. В конкретных вариантах осуществления молекула представляет собой тетрамер

стрептавидина или мутеина стрептавидина, включающий последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 73, 87, 74, 92, 94, 88 или 79, которая в случае тетрамера представляет собой молекулу, содержащую 20 первичных аминов, включая один N-концевой амин и четыре лизина на один мономер.

[0305] В некоторых вариантах осуществления изобретения мутеин стрептавидина обладает аффинностью связывания, характеризующуюся равновесной константой диссоциации (K_D), которая равна или приблизительно равна, или менее или приблизительно менее $3,7 \times 10^5$ М для пептидного лиганда (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; также называемого Strep-Tag ®, SEQ ID NO: 81) и/или которая равна или приблизительно равна, или менее или приблизительно менее $7,1 \times 10^5$ М для пептидного лиганда (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; также называемого Strep-tag ® II, SEQ ID NO: 75) и/или которая равна или приблизительно равна, или менее или приблизительно менее $7,0 \times 10^5$ М, $5,0 \times 10^6$ М, $1,0 \times 10^5$ М, $5,0 \times 10^6$ М, $1,0 \times 10^6$ М, $5,0 \times 10^7$ М или $1,0 \times 10^7$ М, но обычно больше или приблизительно больше 1×10^{-13} М, 1×10^{-12} М или 1×10^{-11} М для любого из пептидных лигандов, представленных в любой из SEQ ID NO: 75, 82-85, 76-78, 80, 81, 89 и 90.

[0306] В некоторых вариантах осуществления изобретения, полученный мутеин стрептавидина имеет аффинность связывания, характеризуемой равновесной константой ассоциации (K_A), которая равна или приблизительно равна, или больше или приблизительно больше величины $2,7 \times 10^4$ M^{-1} для пептидного лиганда (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; также называемого Strep-tag®, SEQ ID NO: 81), которая равна или приблизительно равна, или больше или приблизительно больше величины $1,4 \times 10^4$ M^{-1} для пептидного лиганда (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; также называемого Strep-tag ® II, SEQ ID NO: 75) и/или которая равна или приблизительно равна, или больше или приблизительно больше $1,43 \times 10^4$ M^{-1}, $1,67 \times 10^4$ M^{-1}, 2×10^4 M^{-1}, $3,33 \times 10^4$ M^{-1}, 5×10^4 M^{-1}, 1×10^5 M^{-1}, $1,11 \times 10^5$ M^{-1}, $1,25 \times 10^5$ M^{-1}, $1,43 \times 10^5$ M^{-1}, $1,67 \times 10^5$ M^{-1}, 2×10^5 M^{-1}, $3,33 \times 10^5$ M^{-1}, 5×10^5 M^{-1}, 1×10^6 M^{-1}, $1,11 \times 10^6$ M^{-1}, $1,25 \times 10^6$ M^{-1}, $1,43 \times 10^6$ M^{-1}, $1,67 \times 10^6$ M^{-1}, 2×10^6 M^{-1}, $3,33 \times 10^6$ M^{-1}, 5×10^6 M^{-1}, 1×10^7 M^{-1}, но обычно меньше 1×10^{13} M^{-1}, 1×10^{12} M^{-1} или 1×10^{11} M^{-1} для любого из пептидных лигандов, указанных в любой из SEQ ID NO: 75, 82-85, 76-78, 80, 81, 89 и 90.

[0307] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается олигомерный реагент на частицах, который содержит и/или состоит из множества тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения олигомерный реагент на частицах содержит множество сайтов связывания, которые обратимо связываются или способны обратимо связываться с одним или несколькими агентами, например со стимулирующим агентом и/или агентом для отбора. В некоторых вариантах олигомерная частица имеет радиус, например, средний радиус, от или приблизительно от 70 нм до или приблизительно до 125 нм включительно; молекулярную массу от или приблизительно от 1×10^7 г/моль до или приблизительно до 1×10^9 г/моль включительно; и/или содержит от или приблизительно

от 1000 до или приблизительно до 5000 включительно тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах олигомерный реагент на частицах связан, например, обратимо связан, с одним или несколькими агентами, такими как агент, который связывается с молекулой, такой как рецептор на поверхности клетки. В некоторых вариантах один или несколько агентов представляют собой или содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab. В некоторых вариантах осуществления один или несколько агентов специфически связываются с одной или более из следующих макромолекул на клетке (например, Т-клетке): CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-l), CD127, MHCI, MHCII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27l (CD70) 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R, IFN-гамма R, TNF-альфа, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1), CD62L (L-селектин), CD29/CD49d (VLA-4), лиганд Notch (например, дельта-подобный 1/4, Jagged 1/2 и др.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 и CXCR3, или их фрагменты, включая соответствующие лиганды для этих макромолекул или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько агентов специфически связываются с одной или несколькими из следующих макромолекул на клетке (например, Т-клетке): CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO. В некоторых вариантах осуществления один или несколько агентов включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab, и антитело может включать поликлональное антитело, моноклональное антитело (включая полноразмерные антитела, которые имеют Fc-область иммуноглобулина), композиции антител с полиэпитопной специфичностью, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, диатела и одноцепочечные молекулы, а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')2 и Fv). В некоторых вариантах осуществления один или несколько реагентов представляют собой или содержат фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), например фрагмент Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')2. Очевидно, что для рассматриваемых здесь антител могут быть использованы константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области могут быть получены из любого вида животного (например, грызунов) или от человека. В некоторых вариантах один или несколько реагентов представляют собой или содержат антитело, которое связывает и/или распознает один или несколько компонентов Т-клеточного рецептора. В конкретных вариантах осуществления один или несколько реагентов представляют собой или содержат анти-CD3-антитело. В некоторых вариантах осуществления один или несколько реагентов представляют собой или содержат антитело, которое связывает и/или распознает корецептор. В некоторых вариантах один или несколько реагентов представляют собой или содержат анти-CD28-антитело. В некоторых вариантах осуществления один или несколько реагентов представляют собой или содержат анти-CD3 и/или анти-CD28-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например, антитело или его антигенный фрагмент, который содержит партнер

связывания, например, стрептавидин-связывающий пептид, например Strep-tag ® II. В конкретных вариантах осуществления один или несколько агентов представляют собой или содержат анти-CD3 и/или анти-CD28-Fab, содержащий партнер связывания, например, стрептавидин-связывающий пептид, например Strep-tag® II.

[0308] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается олигомерный реагент на частицах, который состоит из и/или содержит множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения олигомерный реагент на частицах содержит множество сайтов связывания, которые обратимо связываются или способны обратимо связываться с одним или несколькими агентами, например стимулирующим агентом и/или агентом для отбора. В некоторых вариантах осуществления олигомерная частица имеет радиус, например средний радиус, от или приблизительно от или приблизительно от 80 нм до или приблизительно до 120 нм включительно; молекулярную массу от или приблизительно от 1×10^6 г/моль до или приблизительно до 1×10^8 г/моль включительно; и/или содержит от или приблизительно от 500 до или приблизительно до 10000 включительно тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерный реагент на частицах связан, например, с реагентом, обратимо связывающимся с одним или несколькими агентами, такими как агент, который связывается с молекулой, например рецептором, на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой анти-CD3 и/или анти-CD28 Fab, такой как Fab, который содержит партнера связывания, например стрептавидин связывающий-пептид, например Strep-Tag® II. В конкретных вариантах осуществления одним или несколькими агентами является анти-CD3 и/или анти-CD28 Fab, содержащий партнер связывания, например, стрептавидин-связывающий пептид, например Strep-tag® II.

[0309] В некоторых вариантах осуществления клетки стимулируют в присутствии олигомерного стимулирующего реагента, в количестве, равном, или приблизительно равном, или по меньшей мере, или приблизительно по меньшей мере 0,01 мкг, 0,02 мкг, 0,03 мкг, 0,04 мкг, 0,05 мкг, 0,1 мкг, 0,2 мкг, 0,3 мкг, 0,4 мкг, 0,5 мкг, 0,75 мкг, 1 мкг, 2 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг, 6 мкг, 7 мкг, 8 мкг, 9 мкг или 10 мкг, на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки стимулируют в присутствии олигомерного стимулирующего реагента в количестве равном или приблизительно равном 4 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления клетки стимулируют в присутствии олигомерного стимулирующего реагента в количестве равном или приблизительно равном 0,8 мкг на 10^6 клеток. В некоторых аспектах 4 мкг олигомерного стимулирующего реагента включает или содержит 3 мкг или приблизительно 3 мкг олигомерных частиц и 1 мкг или приблизительно 1 мкг присоединенных агентов, например, 0,5 мкг или приблизительно 0,5 мкг анти-CD3 Fab и 0,5 мкг или приблизительно 0,5 мкг анти-CD28 Fab.

2. Удаление стимулирующего агента из клеток

[0310] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток или клеточных популяций до отбора, сбора клеток или приготовления конечной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующие реагенты удаляют или отделяют от клеток или клеточных популяций после или во время стадии инкубирования, например, инкубирования, как описано здесь, например, в Разделе I-D. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки или клеточную популяцию подвергают процессу, процедуре, стадии или способу удаления стимулирующего реагента после инкубирования, но до стадий отбора, сбора клеток или приготовления конечной композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления клетки или клеточную популяцию подвергают процессу, процедуре, стадии или способу удаления стимулирующего реагента после инкубирования. В некоторых аспектах, когда стимулирующий реагент отделяют или удаляют из клеток во время инкубирования, клетки возвращают в те же условия инкубирования, что и перед отделением или удалением реагента, на оставшееся время инкубирования.

[0311] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток. В конкретных вариантах осуществления связывание и/или ассоциация стимулирующего реагента с клетками при некоторых обстоятельствах может уменьшаться с течением времени во время инкубирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения могут быть добавлены один или несколько агентов для уменьшения связывания и/или ассоциации между стимулирующим реагентом и клетками. В конкретных вариантах осуществления изобретения изменение условий культивирования клеток, например, путем добавления агента и/или изменения температуры и/или изменения pH, среды может снижать связывание и/или ассоциацию между стимулирующим реагентом и клетками. Таким образом, в некоторых вариантах стимулирующий реагент может быть удален из инкубируемой культуры, системы клеточной культуры и/или раствора отдельно от клеток, например, без удаления клеток из инкубируемой культуры, системы клеточной культуры и/или раствора.

[0312] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент отделяют и/или удаляют из клеток после определенного периода времени. В конкретных вариантах осуществления изобретения это время является величиной времени от начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления изобретения начало инкубирования рассматривается как время, когда клетки контактируют со стимулирующим реагентом и/или средой или раствором, содержащим стимулирующий реагент. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток через или приблизительно через 120 часов, 108 часов, 96 часов, 84 часов, 72 часов, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов или 12 часов включительно после инициирования стимуляции. В конкретных вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток через 48 часов после инициирования стимуляции. В некоторых вариантах стимулирующий реагент удаляют

или отделяют от клеток через 72 часа после инициирования стимуляции. В некоторых вариантах стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток через 96 часов после инициирования стимуляции.

[0313] Способы удаления из клеток стимулирующих реагентов (например, стимулирующих реагентов, которые представляют собой частицы или содержат частицы, такие как шарики или намагничивающиеся шарики), являются известными. В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий агент на шариках, например, конъюгированный с анти-CD3/анти-CD28-антителом, отделяют или удаляют из клеток или клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления можно использовать конкурирующие антитела, такие как немеченые антитела, например такие, которые связываются с первичным антителом стимулирующего реагента и изменяют его аффинность по отношению к его антигену на клетке, обеспечивая, таким образом, легкое отделение. В некоторых случаях после отделения конкурирующие антитела могут оставаться связанными с частицей (например, частицей в виде шарика), в то время как непрореагировавшее антитело вымывают или оно может вымываться, и клетка освобождается для дальнейшего выделения, сбора, обогащения и/или активации антителом. Примером такого реагента является DETACaBEAD (Friedl et al. 1995; Entschladen et al. 1997). В некоторых вариантах осуществления частицы (например, частицы в виде шариков) могут быть удалены в присутствии расщепляемого линкера (например, ДНК-линкера), посредством которого связанные с частицами антитела конъюгированы с линкером (например, CELLection, Dynal). В некоторых случаях линкерная область обеспечивает расщепляемый участок для удаления частиц (например, частиц в виде шариков) от клеток после выделения клеток, например, добавлением ДНК-азы или другого высвобождающего буфера. В некоторых вариантах осуществления изобретения также могут быть использованы другие ферментативные способы для отделения частиц (например, частиц в виде шариков) от клеток. В некоторых вариантах частицы (например, частицы в виде шариков или намагничивающихся шариков) являются биоразлагаемыми.

[0314] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующим реагентом является магнитный, парамагнитный и/или суперпарамагнитный реагент и/или он содержит шарик, который является магнитным, парамагнитным и/или суперпарамагнитным, и стимулирующий реагент может быть удален из клеток путем воздействия на клетки магнитным полем. Примеры подходящего оборудования, содержащего магниты для создания магнитного поля, включают установки DynaMag CTS (Thermo Fisher), Magnetic Separator (Takara) и EasySep Magnet (Stem Cell Technologies).

[0315] В конкретных вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток до завершения предлагаемых способов, например, перед сбором клеток или приготовления конечной композиции сконструированных клеток, полученных описанными здесь способами. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток

после стадии конструирования клеток, например трансдукцией или трансфекцией. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют после культивирования клеток, например, перед культивированием сконструированных клеток, например трансфицированных или трансдуцированных клеток, в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляется после того, как клетки достигают порогового количества, плотности и/или уровня размножения во время культивирования клеток. В некоторых вариантах стимулирующий реагент удаляют перед сбором клеток, таких как культивируемые клетки, которые достигли порогового количества, концентрации или уровня размножения.

[0316] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент на шариках, например стимулирующий реагент на магнитных шариках удаляют или отделяют от клеток или клеточных популяций до отбора, сбора клеток или приготовления конечной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий реагент на шариках, например стимулирующий реагент на магнитных шариках, удаляют или отделяют от клеток или клеточных популяций путем воздействия магнитного поля во время или после инкубирования, например такого, как описано в Разделе I-D. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки или клеточную популяцию подвергают воздействию магнитного поля для удаления стимулирующего реагента на шариках, например стимулирующего реагента на магнитных шариках, после инкубирования, но до стадий отбора, сбора клеток или приготовления конечной композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления клетки или клеточная популяция подвергают воздействию магнитного поля для удаления стимулирующего реагента на шариках, например, стимулирующего реагента на магнитных шариках, после инкубирования. В некоторых аспектах, когда реагент для стимуляции шариков отделяют или удаляют из клеток или клеточной популяции во время инкубирования, клетки или клеточную популяцию возвращают в те же условия инкубирования, которые имели место перед воздействием магнитного поля, на оставшееся время инкубирования.

[0317] В конкретных вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент на шариках, например стимулирующий реагент на магнитных шариках удаляют или отделяют от клеток, например, воздействием магнитного поля, через или приблизительно через 120 часов, 108 часов, 96 часов, 84 часов, 72 часов, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов или 12 часов включительно, после инициирования стимуляции. В некоторых вариантах стимулирующий реагент на шариках, например стимулирующий реагент на магнитных шариках удаляют или отделяют от клеток, например, воздействием магнитного поля, через или приблизительно через 72 часа после инициирования стимуляции. В некоторых вариантах стимулирующий реагент на шариках, например стимулирующий реагент на магнитных шариках, удаляют или отделяют от клеток, например, воздействием магнитного поля, через или приблизительно через 96 часов после инициирования стимуляции.

[0318] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент отделяют и/или удаляют из клеток после определенного периода времени. В конкретных вариантах осуществления изобретения это время является величиной времени от начала и/или инициирования инкубирования в условиях стимуляции. В конкретных вариантах осуществления начало инкубирования рассматривается как время, когда клетки контактируют со стимулирующим реагентом и/или средой или раствором, содержащим стимулирующий реагент. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток через или приблизительно через 28 дней, 21 дня, 20 дней, 19 дней, 18 дней, 17 дней, 16 дней, 15 дней, 14 дней, 13 дней, 12 дней, 11 дней, 10 дней и 9 дней после начала или инициирования инкубирования. В некоторых вариантах стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток через или приблизительно через 28 дней, 21 дня, 20 дней, 19 дней, 18 дней, 17 дней, 16 дней, 15 дней, 14 дней, 13 дней, 12 дней, 11 дней, 10 дней, 9 дней после того, как CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки объединяют, комбинируют и/или смешивают с получением входной композиции. В некоторых вариантах стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток через или приблизительно через 28 дней, 21 дня, 20 дней, 19 дней, 18 дней, 17 дней, 16 дней, 15 дней, 14 дней, 13 дней, 12 дней, 11 дней, 10 дней, через 9 дней после получения, выделения, обогащения и/или отбора CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток из биологического образца.

[0319] В некоторых вариантах осуществления изобретения удаление стимулирующего агента, такого как олигомерный стимулирующий реагент, как описано здесь, включает добавление к популяции инкубированных Т-клеток вещества, такого как конкурентный агент, которое добавляют к Т-клеткам для нарушения, например, для уменьшения и/или прекращения, передачи сигналов стимулирующего агента или агентов. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция инкубированных Т-клеток содержит вещество, такое как конкурентный агент, например биотин или аналог биотина, например, D-биотин. В некоторых вариантах осуществления вещество, такое как конкурентный агент, например биотин или аналог биотина, например D-биотин, присутствует в количестве, которое по меньшей мере в 1,5 раза больше по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 1000 раз или более, больше количества вещества в референсной популяции или препарате культивируемых Т-клеток, к которым это вещество не было экзогенно добавлено во время инкубирования. В некоторых вариантах осуществления количество вещества, такого как конкурентный агент, например биотин или аналог биотина, например D-биотин, в популяции культивируемых Т-клеток составляет от или приблизительно от 10 мкМ до или приблизительно до 100 мкМ, от или приблизительно от 100 мкМ до или приблизительно до 1 мМ, от или приблизительно от 100 мкМ до или приблизительно до 500 мкМ, или от или приблизительно от 10 мкМ до или приблизительно до 100 мкМ. В некоторых вариантах осуществления для отделения или удаления олигомерного стимулирующего

реагента из клеток или клеточной популяции к клеткам или клеточной популяции добавляют 10 мкМ или приблизительно 10 мкМ биотина или аналога биотина, например, D-биотина.

[0320] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько агентов (например, агенты, которые стимулируют или активируют TCR и/или рецептор) ассоциирую, например, обратимо связывают, с олигомерным реагентом, например, через множество конкретных сайтов связывания (например, сайтов связывания Z), присутствующих на олигомерном реагенте. В некоторых случаях это приводит к тому, что агенты расположены близко друг к другу, и в этом случае может иметь место авидность, если целевая клетка, имеющая на клеточной поверхности молекулу (по меньшей мере две копии), которая связывается или распознается агентом, при контакте с агентом. В некоторых аспектах реагент, связывающийся с рецептором, имеет низкое сродство к молекуле рецептора клетки в сайте связывания B, так что реагент, связывающий рецептор, в присутствии конкурентного реагента диссоциирует из клетки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления агенты удаляют из клеток в присутствии конкурентного реагента.

[0321] В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерный стимулирующий реагент представляет собой конъюгат мутеин стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3 и анти-CD28 Fab. В некоторых вариантах осуществления Fab связаны с доменами связывания стрептавидиина, например с такими, которые допускают обратимое присоединение к олигомеру мутеина стрептавидина. В некоторых случаях анти-CD3 и анти-CD28 Fab расположены близко друг к другу, что приводит к возникновению авидности, когда Т-клетки, экспрессирующие CD3 и/или CD28, приводят в контакт с олигомерным стимулирующим реагентом с обратимо присоединенным Fab, В некоторых аспектах Fab имеют низкое сродство к CD3 и CD28, и в присутствии конкурентного реагента, например биотина, или варианта или аналога биотина, Fab диссоциирует из клеток. Таким образом, в некоторых вариантах Fab удаляют или диссоциируют из клеток в присутствии конкурентного реагента, например D-биотина.

[0322] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий олигомерный реагент, например стимулирующий олигомерный реагент, представляющий собой мутеин стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток или клеточных популяций до отбора, сбора клеток или приготовления конечной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий олигомерный реагент, например стимулирующий олигомерный реагент, представляющий собой мутеин стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток или клеточных популяций путем контактирования или воздействия на конкурентный реагент, например, биотин или аналог биотина, такой как D-биотин, после или во время инкубирования, например, инкубирования, которое описано здесь в Разделе I-D. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки или клеточную популяцию приводят в контакт или подвергают воздействию конкурентного реагента, например биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, для удаления

стимулирующего олигомерного реагента, например стимулирующего олигомерного мутеина стрептавидина, после инкубирования, но до стадий отбора, сбора клеток или приготовления конечной композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления клетки или клеточную популяцию приводят в контакт или подвергают воздействию конкурентного реагента, например биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, для удаления стимулирующего олигомерного реагента, например стимулирующего олигомерного мутеина стрептавидина, после инкубирования. В некоторых аспектах, когда стимулирующий олигомерный реагент, например стимулирующий олигомерный реагент, представляющий собой мутеин стрептавидина, отделяют или удаляют из клеток во время инкубирования, например, путем приведения в контакт или воздействия конкурентного реагента, например биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, и клетки возвращают в те же условия инкубации, что и до отделения или удаления, на оставшееся время инкубирования.

[0323] В некоторых вариантах осуществления изобретения, для удаления или отделения олигомерного стимулирующего реагента от клеток клетки приводят в контакт с конкурентным реагентом в количестве, равном или приблизительно равном, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 0,01 мкМ, 0,05 мкМ, 0,1 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ, 0,01 мкМ, 1 мМ или 10 мМ. В различных вариантах осуществления изобретения, для удаления или отделения от клеток олигомерного стимулирующего реагента, такого как олигомера мутеина стрептавидина, с обратимо присоединенными анти-CD3 и анти-CD28 Fab, клетки приводят в контакт с биотином или аналогом биотина, такого как D-биотин, в количестве, равном или приблизительно равном, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 0,01 мкМ, 0,05 мкМ, 0,1 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ, 0,01 мкМ, 1 мМ или 10 мМ.

[0324] В конкретных вариантах осуществления изобретения стимулирующий олигомерный реагент, например, стимулирующий реагент, представляющий собой олигомер мутеина стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток через или приблизительно через 120 часов, 108 часов, 96 часов, 84 часов, 72 часов, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов или 12 часов включительно, после инициирования стимуляции. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий олигомерный реагент, например, стимулирующий реагент, представляющий собой олигомер мутеина стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток через или приблизительно через 48 часов после инициирования стимуляции. В некоторых вариантах стимулирующий олигомерный реагент, представляющий собой олигомер мутеина стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток через 72 часа после инициирования стимуляции. В некоторых вариантах стимулирующий олигомерный реагент, представляющий собой олигомер мутеина стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток через 96 часа после инициирования стимуляции.

C. Конструируемые клетки

[0325] В некоторых вариантах осуществления изобретения стадии обработки включают воздействие на клетки, например стимулированные клетки, методами инженерного конструирования, такими как условия введения в одну или несколько клеток молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок. Примерами таких рекомбинантных белков являются рекомбинантные рецепторы, такие как описанные в Разделе II. Способы конструирования клеток, такие как введение в клетки молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, могут быть выполнены с использованием любого из известных способов, таких как использование векторов или других агентов, которые содержат полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный белок. Такие векторы включают вирусные и невирусные системы, включая лентивирусные и гамма-ретровирусные системы, а также системы на основе транспозона, такие как системы переноса генов на основе систем PiggyBac или Sleeping Beauty. Примеры таких способов включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, включая, например, способы переноса на основе ретровирусов или лентивирусов, способы трансдукции, способы с использованием транспозонов и электропорацию.

[0326] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки и/или композиции обогащенных Т-клеток подвергают воздействию методами инженерного конструирования, например, способом, который включает трансдукцию или трансфекцию клеток перед их культивированием. В некоторых случаях культивирование проводят в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению, например, способом, представленным здесь в Разделе I-D. В конкретных вариантах осуществления клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования после того, как клетки стимулированы, активированы и/или инкубированы в условиях стимуляции, например любым из способов, описанных здесь в Разделе I-B. В Конкретных вариантах осуществления изобретения стимулированные клетки и/или композиция клеток представляет собой стимулированную композицию клеток, которые прошли инкубирование при стимулирующих условиях, например, как описано в Разделе I-B. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения одна или несколько стимулированных композиций были предварительно заморожены и хранились, и их оттаивали перед стадией конструирования.

[0327] В некоторых вариантах осуществления изобретения совокупность клеток и/или фиксированное количество клеток, например, стимулированных клеток, подвергают воздействию методами инженерного конструирования, например, путем контактирования таких клеток с агентом (например, лентивирусным вектором), содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный белок (например, CAR), например, с использованием методов, таких как трансдукция или трансфекция. В конкретных вариантах осуществления изобретения, клетки, например, стимулированные клетки, в количестве, составляющем от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до 50000×10^6 клеток, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до $50000 \times$

10^6 клеток, от или приблизительно от 10 × 10^6 до или приблизительно до 5000 × 10^6 клеток, от или приблизительно от 1 × 10^6 до или приблизительно до 1000 x 10^6 клеток, от или приблизительно от 50 x 10^6 до или приблизительно до 5000 × 10^6 клеток, от или приблизительно от 10 x 10^6 до или приблизительно до 1000 x 10^6 клеток, от или приблизительно от 50 x 10^6 до или приблизительно до 500 × 10^6 клеток, подвергают воздействию методами инженерного конструирования, например, трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 50 × 10^6 клеток, 100 × 10^6 клеток, 150 × 10^6 клеток, 200 × 10^6 клеток или 250 × 10^6 клеток подвергают воздействию методами инженерного конструирования. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 100 × 10^6 клеток подвергают воздействию методами инженерного конструирования. В конкретных вариантах осуществления изобретения вплоть до 200 × 10^6 клеток подвергают воздействию методами инженерного конструирования. В конкретных вариантах осуществления от приблизительно 100 × 10^6 до приблизительно 200 × 10^6 клеток подвергаются воздействию методами инженерного конструирования. В некоторых вариантах клетки являются стимулированными клетками. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки являются жизнеспособными клетками. В некоторых вариантах клетки являются негативными по маркеру апоптоза, например, по аннексину V или активированной каспазе 3. В некоторых вариантах осуществления клетки являются жизнеспособными клетками, которые были стимулированы, например, инкубированием в условиях стимуляции.

[0328] В некоторых вариантах осуществления изобретения количество клеток (например, стимулированных клеток), которые должны быть подвергнуты воздействию методами инженерного конструирования, например, путем контактирования таких клеток с агентом (например, лентивирусным вектором), содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный белок (например, CAR), например, трансдукцией или трансфекцией, представляет собой общее количество клеток после активации или стимуляции, количество которых составляет как максимум 200 × 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения для входных композиций, которые происходят от различных доноров, различное количество клеток после активации или стимуляции может быть подвергнуто воздействию методами инженерного конструирования, например трансдукции или трансфекции. В некоторых вариантах осуществления, в тех случаях, когда общее количество клеток после активации или стимуляции составляет или превышает 200 × 10^6, то максимум 200 × 10^6 клеток подвергают воздействию методами инженерного конструирования, в то время как в случаях, когда общее количество клеток после активации или стимуляции составляет менее 200 × 10^6, то все клетки после активации или после стимуляции подвергают воздействию методами инженерного конструирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки являются стимулированными клетками. В конкретных вариантах осуществления клетки являются жизнеспособными клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки являются

негативными по маркеру апоптоза, например, по аннексину V или активированной каспазе 3. В некоторых вариантах клетки являются жизнеспособными клетками, которые были стимулированы, например, путем инкубирования в условиях стимуляции.

[0329] В некоторых вариантах осуществления изобретения перенос гена осуществляют путем первого стимулирования клетки, например, путем объединения его со стимулирующим средством, которое индуцирует ответ, такой как пролиферация, выживание и/или активация, измеренный, например, с помощью экспрессии цитокина или маркера активации, с последующим трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до их количества, достаточного для клинических применений. В некоторых вариантах осуществления изобретения перенос гена осуществляют путем первого инкубирования клеток в условиях стимуляции, как описано здесь, например, в Разделе I-B.

[0330] В некоторых вариантах осуществления изобретения способы генной инженерии клеток выполняют путем контактирования одной или нескольких клеток композиции с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантную нуклеиновую кислоту переносят в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (см. например, Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557.

[0331] В некоторых вариантах осуществления изобретения ретровирусный вектор имеет длинную концевую повторяющуюся последовательность (LTR), и представляет собой, например, ретровирусный вектор, полученный из вируса мышиного лейкоза Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса мышиных эбриональных стволовых клеток (MESV), вируса мышиных стволовых клеток (MSCV), вируса, формирующего очаг в селезенке (SFFV), или аденоассоциированного вируса (AAV). Большинство ретровирусных векторов происходят от мышиных ретровирусов. В некоторых вариантах ретровирусы включают те, которые получены из любого источника клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы обычно амфотропны, что означает, что они способны инфицировать клетки-хозяева нескольких видов, включая человека. В одном варианте осуществления экспрессируемый ген заменяет ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Ряд иллюстративных ретровирусных систем известен и описан (см., например, патенты США US 5219740; US 6207453; US 5219740; публикации Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7: 980-990; Miller, AD (1990) Human Gene Therapy 1: 5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180: 849-852; Burns et al. (1993) Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 90: 8033-8037; и Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3: 102-109.

[0332] Способы лентивирусной трансдукции известны. Примеры способов описаны, например, в Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeyen et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; и Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505.

[0333] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки путем электропорации (см. например, Chicaybam et al, (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). В некоторых вариантах осуществления изобретения 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 фосфатом кальция (например, как описано в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Ampand Sons, New York, NY), слияние протопластов, трансфекцию, опосредованную катионной липосомой; бомбардировку микрочастицами, бомбардировку, облегчающую частицами вольфрама (Johnston, Nature, 346:776-777); и соосаждение с фосфатом стронция (Brash et al. Mol. Cell Biol. 7:2031-2034 (1987)).

[0334] Другие подходы и векторы для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, описаны, например, в международной патентной заявке WO 2014055668 и в патенте США US 7446190.

[0335] В некоторых вариантах осуществления изобретения инженерное конструирование, например трансдукцию или трансфекцию, осуществляют в бессывороточных средах. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда представляет собой хорошо известную среду для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда представляет собой среду с контролируемыми показателями, которая была обработана, например, отфильтрована, для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда содержит белки. В некоторых вариантах осуществления бессывороточные среды могут содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы присоединения.

[0336] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, например стимулированные клетки, подвергают инженерному конструированию, например, трансдукции или трансфекции, в присутствии адъюванта трансдукции. Примеры адъювантов трансдукции включают, без ограничения, поликатионы, фибронектин или полученные из фибронектина фрагменты или варианты, и ретронектин. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования в присутствии поликатионов, фибронектина или полученных из фибронектина фрагментов или вариантов, и/или ретронектина. В

конкретных вариантах осуществления изобретения клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования в присутствии поликатиона, который является полибреном, DEAE-декстраном, сульфатом протамина, поли-L-лизином или катионной липосомой. В конкретных вариантах клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования в присутствии сульфата протамина.

[0337] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, например стимулированные клетки, подвергают инженерному конструированию, например, трансдукции или трансфекции, в отсутствии адъюванта трансдукции. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления изобретения клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования в отсутствие поликатионов, фибронектина или полученных из фибронектина фрагментов или вариантов, и ретронектина. В конкретных вариантах осуществления клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования в отсутствие поликатиона, такого как полибрен, DEAE-декстран, сульфата протамина, поли-L-лизина или катионной липосомы. В конкретных вариантах клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования в отсутствие сульфата протамина.

[0338] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, например Т-клетки, можно трансдуцировать либо во время, либо после активации, стимуляции и/или размножения, например, с помощью Т-клеточного рецептора (TCR) или химерного антигена (CAR). Эта трансдукция для введения гена желаемого рецептора может быть осуществлена, например, с использованием любого подходящего ретровирусного вектора. Затем генетически модифицированная клеточная популяция может освобождаться от начального стимула (например, стимула CD3/CD28), и затем стимулироваться вторым типом стимула (например, через введенный de novo рецептор). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме молекулы пептида/MHC, родственный (перекрестный) лиганд генетически введенного рецептора (например, природный лиганд CAR) или любой лиганд (такой как антитело), который непосредственно связывается с каркасом нового рецептора (например, путем распознавания константных областей внутри рецептора). См. например, Cheadle et al, “Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy” Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66, или Barrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014).

[0339] В некоторых аспектах изобретения клетки дополнительно подвергают воздействию методами инженерного конструирования для стимуляции экспрессии цитокинов или других факторов. Среди дополнительных нуклеиновых кислот, например, генов для введения, используются гены, которые обеспечивают улучшение эффективности терапии, например, путем промотирования жизнеспособности и/или функции переносимых клеток; генов генетического маркера для отбора и/или оценки клеток, например для оценки выживания или локализации in vivo; генов для повышения безопасности, например, путем получения клеток, чувствительных к негативному отбору in vivo, как описано в Lupton S. D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991); и Riddell et al.,

Human Gene Therapy 3:319-338 (1992); а также в заявках PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 (Lupton et al.), где описано применение бифункциональных селективных слитых генов, полученных слиянием доминантного положительного маркера селекции с негативным маркером селекции (см., также Riddell et al., патент США № 6040177, кол. 14-17).

[0340] В некоторых вариантах осуществления изобретения введение осуществляют путем контактирования одной или нескольких клеток композиции с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантным рецептор. В некоторых вариантах осуществления контактирование может быть осуществлено с помощью центрифугирования, такого как спинокуляция (например, центробежная инакуляция). Такие способы включают любые из способов, которые описаны в международной публикации WO 2016/073602. Примеры центрифужных камер включают камеры, которые производит и поставляет Biosafe SA, включая такие, которые предназначены для использования с системой Sepax® и Sepax® 2, включая центрифужные камеры A-200/F и A-200, и различные наборы для использования с такими системами. Типовые камеры, системы и оборудование для обработки, а также шкафы для них, описаны, например, в патенте США US 6123655, патенте США № 6733433 и в опубликованной заявке на патент США US 2008/0171951 и в опубликованной международной патентной заявке WO 00/38762. Содержание каждого из указанных документов во всей их полноте включено сюда посредством ссылки. Примеры наборов для использования с такими системами включают, без ограничения, одноразовые наборы, поставляемые BioSafe SA под названиями продуктов CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 или CS-900.2.

[0341] В некоторых вариантах осуществления изобретения система включает и/или используется совместно с другими измерительными приборами, включая инструментальные средства для работы, автоматизации, управления и/или мониторинга аспектов стадии трансдукции и одной или нескольких различных других стадий обработки, выполняемых в системе, например, одной или нескольких стадий обработки, которые могут быть выполнены с помощью или с использованием системой центрифужной камеры, как описано в данном документе или в международной публикации WO 2016/073602. Эта аппаратура в некоторых вариантах осуществления изобретения находится внутри шкафа. В некоторых вариантах измерительная аппаратура включает шкаф, включающий корпус, в котором находится схема управления, центрифуга, крышка, двигатели, насосы, датчики, дисплеи и пользовательский интерфейс. Пример такого устройства описан в патенте США US 6125555, патенте США US 6733433 и в US 2008/0171951.

[0342] В некоторых вариантах осуществления изобретения система содержит ряд контейнеров, например, пакетов/мешков, трубопроводов, запорных кранов, зажимов, соединителей и центрифужной камеры. В некоторых вариантах осуществления контейнеры, такие как пакеты/мешки, включают один или несколько контейнеров, таких

как пакеты/мешки, содержащие трансдуцируемые клетки, и частицы вирусного вектора в одном контейнере или в отдельных контейнерах, таких как мешок или отдельные пакеты. В некоторых вариантах система дополнительно включает один или несколько контейнеров, таких как мешки, содержащие среду, разбавитель и/или промывочный раствор, которые подаются в камеру, и/или другие компоненты для разбавления, ресуспендирования и/или промывки компонентов и/или композиций во время выполнения способа. Контейнеры могут быть соединены в системе в одном или нескольких положениях, например в положении, соответствующем входной линии, линии разбавителя, линии промывки, линии отходов и/или выходной линии.

[0343] В некоторых вариантах осуществления изобретения камера связана с центрифугой, которая обеспечивает вращение камеры, например, вокруг своей оси вращения. Вращение может происходить до, во время и/или после инкубирования для трансдукции клеток, и/или на одной или нескольких других технологических стадиях. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько различных стадий обработки выполняют при вращении, например, при определенной силе вращения. Камера обычно выполнена с возможностью вертикального или преимущественно вертикального вращения таким образом, что во время центрифугирования камера находится в вертикальном положении, и боковая стенка и ось являются вертикальными или преимущественно вертикальными, при этом торцевая стенка (стенки) находятся в горизонтальном плоскости, или преимущественно в горизонтальной плоскости.

[0344] В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию, содержащую клетки, и композицию, содержащую частицы вирусного вектора, и необязательно воздух, могут быть объединены или смешаны перед подачей композиций в камеру. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую клетки и композицию, содержащую частицы вирусного вектора, и необязательно воздух, получают отдельно, и объединяют и перемешивают в камере. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая клетки, композиция, содержащая частицы вирусного вектора, и необязательно воздух, могут быть введены во внутреннюю полость камеры в любом порядке. В любом из таких вариантов осуществления композиция, содержащая клетки и частицы вирусного вектора, представляет собой входную композицию, после того, как они будут объединены или смешаны друг с другом, независимо от того, происходит ли объединение или смешивание внутри или вне центрифужной камеры, и/или же клетки и частицы вирусного вектора подаются в центрифужную камеру вместе или раздельно, например, одновременно или последовательно.

[0345] В некоторых вариантах осуществления изобретения, поглощение объема газа, такого как воздух, при трансдукции происходит до инкубирования с вращением клеток и частиц вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления поглощение

объема газа, такого как воздух, при трансдукции происходит во время инкубирования с вращением клеток и частиц вирусного вектора.

[0346] В некоторых вариантах осуществления изобретения объем жидкости для клеток или частиц вирусного вектора, которые составляют композицию для трансдукции, и, необязательно, объем воздуха, может быть заданным объемом. Объем может быть объемом, который программируется и/или управляется схемой, связанной с системой.

[0347] В некоторых вариантах осуществления изобретения введение композиции для трансдукции и, необязательно, газа, такого как воздух, регулируют вручную, полуавтоматически и/или автоматически до тех пор, пока не будет достигнут требуемый или заданный объем во внутренней полости камеры. В некоторых вариантах осуществления датчик, связанный с системой, может контролировать жидкость и/или газ, подаваемый в центрифужную камеру и выходящий из нее, например, по цвету, скорости потока и/или плотности, и он может быть связан с соответствующими схемами для остановки или продолжения подачи по мере необходимости до тех пор, пока не будет достигнут требуемый или заданный объем жидкости и/или газа. В некоторых аспектах датчик, который запрограммирован или способен обнаруживать жидкость в системе, но не газ (например, воздух), может быть выполнен с возможностью пропускания газа, такого как воздух, в систему без остановки подачи. В некоторых таких вариантах осуществления непрозрачный кусок трубки может быть установлен в линию вблизи датчика, когда подача газа, такого как воздух, является желательным. В некоторых вариантах подачу газа, такого как воздух, можно регулировать вручную.

[0348] В некоторых аспектах заявленных способов обеспечивают высокоскоростное вращение внутренней полости камеры центрифуги. В некоторых вариантах вращение осуществляют до, одновременно или периодически вместе с подачей жидкой входной композиции и необязательно воздуха. В некоторых вариантах осуществления изобретения вращение осуществляют после подачи жидкой входной композиции и необязательно воздуха. В некоторых вариантах осуществления вращение осуществляют путем вращения центрифужной камеры при относительной центрифужной силе на внутренней поверхности боковой стенки внутренней полости и/или на поверхностном слое клеток, равной, приблизительно равной, или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 800 g, 1000 g, 1100 g, 1500, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2500 g, 3000 g, 3500 g или 4000 g. В некоторых вариантах осуществления изобретения вращение осуществляют путем центрифугирования при усилии, которое больше или приблизительно больше 1100 g, например, больше или приблизительно больше 1200 g, больше или приблизительно больше 1400 g, больше или приблизительно больше 1600 g, больше или приблизительно больше 1800 g, больше или приблизительно больше 2000 g, больше или приблизительно больше 2400 g, больше или приблизительно больше 2800 g, больше или приблизительно больше 3000 g или больше или приблизительно больше 3200 g. В некоторых вариантах осуществления вращение происходит путем центрифугирования при силе, которая равна или приблизительно равна 1600 g.

[0349] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ трансдукции включает вращение или центрифугирование композиции для трансдукции и необязательно воздуха в центрифужной камере в течение более или приблизительно более 5 минут, например, более или приблизительно более 10 минут, более или приблизительно более 15 минут, более или приблизительно более 20 минут, более или приблизительно более 30 минут, более или приблизительно более 45 минут, более или приблизительно более 60 минут, более или приблизительно более 90 минут или более или приблизительно более 120 минут. В некоторых вариантах осуществления композицию для трансдукции и необязательно воздух вращают или центрифугируют в центрифужной камере в течение более 5 минут, но не более 60 минут, не более 45 минут, не более 30 минут или не более 15 минут. В конкретных вариантах осуществления трансдукция включает вращение или центрифугирование в течение или приблизительно в течение 60 минут.

[0350] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ трансдукции включает вращение или центрифугирование композиции трансдукции и необязательно воздуха в центрифужной камере в течение от или приблизительно от 10 минут до или приблизительно до 60 минут, от или приблизительно от 15 минут до или приблизительно до 60 минут, от или приблизительно от 15 минут до или приблизительно до 45 минут, от или приблизительно от 30 минут до или приблизительно до 60 минут или от или приблизительно от 45 минут до или приблизительно до 60 минут, включительно для каждого, и под действием силы на внутренней поверхности боковой стенки внутренней полости и/или на поверхностном слое клеток по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере при 1000 g, 1100 g, 1200 g, 1400 g, 1500 g, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2400 g, 2800 g, 3200 g или 3600 g. В конкретных вариантах осуществления способ трансдукции включает вращение или центрифугирование композиции трансдукции, например клеток и частиц вирусного вектора, при или приблизительно при 1600 g в течение или приблизительно в течение 60 минут.

[0351] В некоторых вариантах осуществления изобретения газ, такой как воздух, вытесняется из полости камеры. В некоторых вариантах осуществления газ, такой как воздух, выводится в контейнер, который, как часть замкнутой системы, функционально связан с центрифужной камерой. В некоторых вариантах осуществления изобретения контейнер является пустым контейнером. В некоторых вариантах осуществления воздух, такой как газ, вытесняется из полости камеры через фильтр, который функционально соединен с внутренней полостью камеры через стерильный трубопровод. В некоторых вариантах воздух выводится с использованием ручного, полуавтоматического или автоматического процессов. В некоторых вариантах воздух выводится из камеры до, одновременно, периодически или последовательно с выводом из полости камеры выходной композиции, содержащей инкубированные клетки и вирусных векторные частицы, где в клетках была инициирована трансдукция, или клетки были трансдуцированы вирусным вектором.

[0352] В некоторых вариантах осуществления изобретения трансдукция и/или другое инкубирование выполняют как часть непрерывного или полунепрерывного процесса. В некоторых вариантах осуществления непрерывный процесс включает непрерывную подачу клеток и частиц вирусного вектора, например, композиции для трансдукции (либо в виде одной предварительно приготовленной композиции, либо путем непрерывной подачи компонентов в один сосуд, например, в полость, осуществляя тем самым смешивание компонентов и частей) и/или непрерывную подачу или вытеснение жидкости с необязательным вытеснением газа (например, воздуха) из сосуда во время по меньшей мере части процесса инкубирования, например, инкубирования при центрифугировании. В некоторых вариантах осуществления изобретения непрерывную подачу и непрерывный вывод осуществляют, по меньшей мере частично, одновременно. В некоторых вариантах осуществления непрерывная подача происходит в течение части процесса инкубирования, например, в течение периода времени во время части процесса центрифугирования, и непрерывный вывод происходит в течение отдельной части процесса инкубирования. Эти два процесса могут чередоваться. Таким образом, непрерывная подача и непрерывный вывод при инкубирования могут обеспечить больший общий объем обрабатываемого образца, например, трансдуцированием.

[0353] В некоторых вариантах осуществления изобретения инкубирование является частью непрерывного процесса, где во время по меньшей мере части инкубирования способ включает непрерывное введение указанной композиции для трансдукции в полость во время вращения камеры и во время части процесса инкубирования, осуществляя непрерывный вывод жидкости и, необязательно, удаляя газ (например, воздух) из полости во время вращения камеры через по меньшей мере одно отверстие.

[0354] В некоторых вариантах осуществления изобретения полунепрерывное инкубирование выполняют путем чередования поступления композиции в полость, инкубирования, выведения жидкости из полости и, необязательно, выведения газа (например, воздуха) из полости, например, в выходной контейнер, и затем приемом следующей (например, второй, третьей и т.д.) композиции, содержащей следующую часть клеток и других реагентов для обработки, например, вирусных векторных частиц, и повторения процесса. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения инкубирование является частью полунепрерывного процесса, где способ перед инкубацией включает введение композиции для трансдукции в полость через по меньшей мере одно отверстие и последующее инкубирование, с последующим выводом жидкости из полости; введение другой композиции для трансдукции, содержащей клетки и частицы вирусного вектора, в указанную внутреннюю полость и инкубирование другой композиции для трансдукции в указанной внутренней полости в условиях, при которых указанные клетки в указанной другой композиции для трансдукции трансдуцируют указанным вектором. Процесс может продолжаться в виде итеративного способа с выполнением ряда дополнительных циклов. В этом отношении полунепрерывные или

непрерывные способы могут обеспечить получение большего объема и/или количества клеток.

[0355] В некоторых вариантах осуществления изобретения часть стадии инкубирования выполняют в центрифужной камере, в условиях, которые включают вращение или центрифугирование.

[0356] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает инкубирование, в котором дополнительную часть процесса инкубирования клеток и частиц вирусного вектора проводят без вращения или центрифугирования, который обычно проводят после по меньшей мере части инкубирования, которая включает вращение или центрифугирование камеры. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения дополнительное инкубирование осуществляют в условиях, приводящих к интеграции вирусного вектора в геном одной или нескольких клеток-хозяев. Специалист в данной области может оценить или определить, привело ли инкубирование к интеграции частиц вирусного вектора в геном клеток-хозяев, и, следовательно, эмпирически определить условия для дальнейшего инкубирования. В некоторых вариантах выполнения интеграция вирусного вектора в геном клеток-хозяев может быть оценена путем измерения уровня экспрессии рекомбинантного белка, такого как гетерологичный белок, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащейся в геноме частицы вирусного вектора, после инкубирования. Можно использовать ряд хорошо известных способов оценки уровня экспрессии рекомбинантных молекул, таких как обнаружение методами, основанными на аффинной хроматографии, например, методами, основанными на иммуноаффинной хроматографии, например, в отношении белков клеточной поверхности, например методами проточной цитометрии. В некоторых примерах экспрессию измеряют путем детектирования репортерного маркера и/или репортерной конструкции. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая усеченный поверхностный белок, включена в вектор, и ее используют в качестве маркера экспрессии и/или ее усиления.

[0357] В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция, содержащая клетки и вирусные частицы, может подвергаться центрифугированию, как правило, при относительно низкой силе или скорости, которая ниже, чем скорость, используемая для осаждения клеток, например, от или приблизительно от 600 об/мин до или приблизительно до 1700 об/мин (например, при или приблизительно при, или по меньшей при или приблизительно по меньшей мере при 600 об/мин, 1000 об/мин, 1500 об/мин или 1700 об/мин). В некоторых вариантах осуществления вращение осуществляют при силе, например, при относительной силе центрифугирования, составляющей от или приблизительно от 100 g до 3200 г (например, при или приблизительно при, от или приблизительно от 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g или 3200 g), при измерении, например, на внутренней или внешней стенке камеры или полости. Термин "относительная центробежная сила" или "RCF", понимается, как правило, как эффективное усилие, прикладываемое к объекту или веществу (такому как

клетка, образец или частица и/или в точке во вращающейся камере или в полости) относительно силы тяжести земли в конкретной точке в пространстве, по сравнению с осью вращения. Значение может быть определено с использованием хорошо известных формул с учетом силы тяжести, скорости вращения и радиуса вращения (расстояние от оси вращения и объекта, вещества или частицы, в отношении которых измеряют RCF).

[0358] В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию, содержащую клетки и вирусные частицы, подвергают вращению в течение более или приблизительно более 5 минут, например, более или приблизительно более 10 минут, более или приблизительно более 15 минут, более или приблизительно более 20 минут, более или приблизительно более 30 минут, более или приблизительно более 45 минут, более или приблизительно более 60 минут, более или приблизительно более 90 минут или более или приблизительно более 120 минут; или в течение от или приблизительно от 5 минут до или приблизительно до 120 минут, от или приблизительно от 30 минут до или приблизительно до 90 минут, от или приблизительно от 15 минут до или приблизительно до 45 минут, от или приблизительно от 30 минут до или приблизительно до 60 минут или от или приблизительно от 45 минут до или приблизительно до 60 минут, включительно для каждого. В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию подвергают вращению в течение или приблизительно в течение 60 минут.

[0359] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, например, стимулированные клетки, культивируют во время конструирования, например трансдукцией или трансфекцией, при плотности меньше или приблизительно меньше 1×10^7 клеток/мл, 9×10^6 клеток/мл, 8×10^6 клеток/мл, 7×10^6 клеток/мл, 6×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 4×10^6 клеток/мл или 3×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования при плотности от или приблизительно от 1×10^3 клеток/мл до или приблизительно до 1×10^9 клеток/мл, от или приблизительно от 1×10^4 клеток/мл до или приблизительно до 1×10^8 клеток/мл, от или приблизительно от 1×10^5 клеток/мл до или приблизительно до 1×10^7 клеток/мл, или от или приблизительно от 5×10^5 клеток/мл до или приблизительно до 1×10^7 клеток/мл. В конкретных вариантах клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования при плотности равной или приблизительно равной 5×10^5 клеток/мл, 1×10^6 клеток/мл, 2×10^6 клеток/мл, 3×10^6 клеток/мл, 4×10^6 клеток/мл или 5×10^6 клеток/мл. В конкретных вариантах клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования при плотности равной или приблизительно равной 1×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки культивируют после центрифугирования, например, центрифугирования композиции, содержащей клетки, и вирусных частиц. В некоторых вариантах клетки центрифугируют с вирусными частицами.

[0360] В некоторых вариантах осуществления изобретения конструирование клеток включает культивирование, контактирование или инкубирование с вектором, например вирусным вектором или с невирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления

изобретения культивирование, контактирование и/или инкубирование клеток с вектором осуществляют в течение периода времени, равным, приблизительно равным или по меньшей мере равным 4 часа, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 16 часов, 18 часов, 24 часов, 30 часов, 36 часов, 40 часов, 48 часов, 54 часа, 60 часов, 72 часа, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней или более 7 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование, контактирование и/или инкубирование клеток с вектором осуществляют в течение периода времени от 30 минут до 2 часов, от 1 часа до 8 часов, от 6 часов до 12 часов, от 12 часов до 18 часов, от 16 часов до 24 часов, от 18 часов до 30 часов, от 24 часов до 48 часов, от 24 часов до 72 часов, от 42 часов до 54 часов, от 60 часов до 120 часов от 96 часов до 120 часов, от 1 дня и 7 дней, от 3 дней до 8 дней, от 1 дня до 3 дней, от 4 дней до 6 дней или от 4 дней до 5 дней до стадии генетической инженерии. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют, приводят в контакт и/или инкубируют с вектором в течение или приблизительно в течение от 18 часов до 30 часов. В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют, приводят в контакт и/или инкубируют с вектором в течение или приблизительно в течение 24 часов.

[0361] В некоторых вариантах осуществления изобретения, в течение по меньшей мере части стадии инженерного конструирования, например, трансдукции, и/или после стадии инженерного конструирования клетки переносят в мешок биореактора для культивирования генетически сконструированных клеток, например, для культивирования или размножения клеток, как описано выше.

[0362] В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования в присутствии одного или нескольких цитокинов. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько цитокинов являются рекомбинантными цитокинами. В конкретных вариантах осуществления изобретения один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины человека. В некоторых вариантах один или несколько цитокинов связываются и/или способны связываться с рецепторами, которые экспрессируются и/или являются эндогенными по отношению к Т-клеткам. В конкретных вариантах один или несколько цитокинов представляют собой или включают член семейства 4-альфа-спиральных пучков цитокинов. В некоторых вариантах осуществления члены семейства 4-альфа-спиральных пучков цитокинов включают, без ограничения, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-15. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный IL-2.

[0363] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, например, стимулированные клетки, подвергают воздействию методами инженерного

конструирования например, трансдуцированию или трансфицированию, в присутствии одного или нескольких цитокинов, например рекомбинантного цитокина человека, при концентрации от или приблизительно от 1 МЕ/мл до или приблизительно до 1000 МЕ/мл, от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 50 МЕ/мл, от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 100 МЕ/мл, от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл, от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, от или приблизительно от 250 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, или от или приблизительно от 500 МЕ/мл до или приблизительно до 1000 МЕ/мл.

[0364] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, например, стимулированные клетки, подвергают воздействию методами инженерного конструирования например, трансдуцированию или трансфицированию, в присутствии IL-2, например рекомбинантного IL-2 человека, при концентрации от или приблизительно от 1 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 250 МЕ/мл, от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл, от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 150 МЕ/мл, от или приблизительно от 75 МЕ/мл до или приблизительно до 125 МЕ/мл, от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл, или от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 100 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления изобретения, клетки, например, стимулированные клетки и/или клетки стимулированной композиции клеток, инкубируют с рекомбинантным IL-2 в концентрации, равной или приблизительно равной 50 МЕ/мл, 60 МЕ/мл, 70 МЕ/мл, 80 МЕ/мл, 90 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 110 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 130 МЕ/мл, 140 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 160 МЕ/мл, 170 МЕ/мл, 180 МЕ/мл, 190 МЕ/мл или 100 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления клетки, например стимулированные клетки и/или клетки стимулированной композиции клеток, инкубируют в присутствии рекомбинантного IL-2, например, рекомбинантного IL-2 человека, при его концентрации равной или приблизительно равной 100 МЕ/мл.

[0365] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, например, стимулированные клетки, подвергают воздействию методами инженерного конструирования например, трансдуцированию или трансфицированию, в присутствии IL-7, например рекомбинантного IL-7 человека, при концентрации от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 2000 МЕ/мл, от или приблизительно от 500 МЕ/мл до или приблизительно до 1000 МЕ/мл, от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, от или приблизительно от 500 МЕ/мл до или приблизительно до 750 МЕ/мл, от или приблизительно от 750 МЕ/мл до или приблизительно до 1000 МЕ/мл, или от или приблизительно от 500 МЕ/мл до или приблизительно до 700 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления изобретения, клетки, например, стимулированные клетки, инкубируют с рекомбинантным IL-7 в концентрации, равной или приблизительно равной 50 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 200

МЕ/мл, 250 МЕ/мл, 300 МЕ/мл, 350 МЕ/мл, 400 МЕ/мл, 450 МЕ/мл, 500 МЕ/мл, 550 МЕ/мл, 600 МЕ/мл, 650 МЕ/мл, 700 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 800 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 750 МЕ/мл или 1000 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления клетки, например, стимулированные клетки и/или клетки стимулированной композиции клеток, инкубируют в присутствии IL-7, например рекомбинантного IL-7 человека, при его концентрации равной или приблизительно равной 600 МЕ/мл.

[0366] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, например, стимулированные клетки, подвергают воздействию методами инженерного конструирования например, трансдуцированию или трансфицированию, в присутствии IL-15, например рекомбинантного IL-15 человека, при концентрации от или приблизительно от 1 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 250 МЕ/мл, от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл, от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 150 МЕ/мл, от или приблизительно от 75 МЕ/мл до или приблизительно до 125 МЕ/мл, от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл, или от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 100 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления изобретения, клетки, например, стимулированные клетки и/или клетки стимулированной композиции клеток, инкубируют с рекомбинантным IL-15 в концентрации, равной или приблизительно равной 50 МЕ/мл, 60 МЕ/мл, 70 МЕ/мл, 80 МЕ/мл, 90 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 110 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 130 МЕ/мл, 140 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 160 МЕ/мл, 170 МЕ/мл, 180 МЕ/мл, 190 МЕ/мл или 100 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления клетки, стимулированные клетки и/или клетки стимулированной композиции клеток, инкубируют в присутствии рекомбинантного IL-15, например, рекомбинантного IL-15 человека, при его концентрации равной или приблизительно равной 100 МЕ/мл.

[0367] В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки, например, стимулированные клетки, подвергают воздействию методами инженерного конструирования в условиях стимуляции в присутствии IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых вариантах IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются рекомбинантными. В некоторых вариантах IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются человеческими. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный IL-2, IL-7 и/или IL-15 человека. В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают воздействию методами инженерного конструирования, например, трансдукции или трансфекции, в условиях стимуляции в присутствии рекомбинантного IL-2, IL-7 и IL-15.

[0368] В некоторых вариантах предлагаемые способы предусматривают трансдуцирование вирусного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, в менее 300×10^6 клеток, например, клеток стимулированной композиции клеток. В некоторых вариантах выполнения изобретения по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 100×10^6 клеток, например, клеток стимулируемой

композиции клеток подвергают трансдукции. В некоторых вариантах осуществления клетки являются жизнеспособными клетками. В некоторых вариантах осуществления трансдукцию осуществляют в бессывороточных средах. В некоторых вариантах осуществления трансдукцию осуществляют в присутствии IL-2, IL-7 и IL-15. В конкретных вариантах осуществления клетки, например клетки стимулируемой композиции клеток содержат по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95% клеток, которые представляют собой CD4+ Т-клетки или CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления трансдукцию проводят в течение периода времени равного от 24 до 48 часов, от 36 до 12 часов, от 18 до 30 часов или в течение периода времени равного или приблизительно равного 24 часов. В некоторых вариантах осуществления стадию трансдукции инициируют в течение двух дней, в течение 36 часов или в течение 30 часов от начала или инициирования инкубирования, например, в условиях стимуляции.

1. Получение вирусных векторных частиц для трансдукции

[0369] Геном вирусного вектора обычно конструируют в плазмидной форме, которая может быть трансфицирована в упаковывающую или продуцирующую клеточную линию. В любом из таких примеров нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, встраивается или локализуется в вирусном векторе в области, как правило, в несущественной области вирусного генома. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота вводится в вирусный геном вместо определенных вирусных последовательностей для получения вируса, который является дефектным по репликации.

[0370] Любой из множества известных способов может быть использован для получения ретровирусных частиц, геном которых содержит РНК-копию генома вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два компонента вовлечены в создание системы доставки генов на основе вирусов: первый компонент - упаковывающие плазмиды, включающие структурные белки, а также ферменты, необходимые для создания вирусной векторной частицы и, второй компонент - сам вирусный вектор, т.е. генетический материал, который должен быть перенесен. В конструкцию одного или обоих этих компонентов может быть введена защита для биобезопасности.

[0371] В некоторых вариантах осуществления изобретения упаковывающая плазмида может содержать все ретровирусные белки, такие как ВИЧ-1 белки, отличные от оболочечных белков (Naldini et al. 1998). В других вариантах осуществления вирусные векторы могут не содержать дополнительных вирусных генов, которые ассоциированы с вирулентностью, например, vpr, vif, vpu и nef, и/или Tat, первичный трансактиватор ВИЧ. В некоторых вариантах осуществления лентивирусные векторы, такие как лентивирусные векторы на основе ВИЧ, содержат только три гена родительского вируса: gag, pol и rev,

что снижает или устраняет возможность восстановления вируса дикого типа посредством рекомбинации.

[0372] В некоторых вариантах осуществления изобретения геном вирусного вектора вводят в линию упаковывающих клеток, которая содержит все компоненты, необходимые для упаковки вирусной геномной РНК, транскрибированной из генома вирусного вектора, в вирусные частицы. Альтернативно, геном вирусного вектора может содержать один или несколько генов, кодирующих вирусные компоненты, в дополнение к одной или нескольким последовательностям, например рекомбинантным нуклеиновым кислотам, представляющим интерес. В некоторых аспектах для предотвращения репликации генома в клетке-мишени эндогенные вирусные гены, необходимые для репликации, удаляют и их сохраняют отдельно в линии упаковывающих клеток.

[0373] В некоторых вариантах осуществления изобретения линию упаковывающих клеток трансфицируют одним или несколькими плазмидными векторами, содержащими компоненты, необходимые для получения частиц. В некоторых вариантах осуществления линию упаковывающих клеток трансфицируют плазмидой, содержащей геном вирусного вектора, включая LTR, цис-действующую упаковочную последовательность и последовательность, представляющую интерес, т.е. нуклеиновую кислоту, кодирующую рецептор антигена , такой как CAR; и одной или несколькими хелперными плазмидами, кодирующими вирусные ферментативные и/или структурные компоненты, такие как Gag, pol и/или rev. В некоторых вариантах осуществления изобретения для отделения различных генетических компонентов, которые формируют частицы ретровирусных векторов, используют несколько отдельных векторов. В таких вариантах осуществления изобретения введение в упаковочную клетку отдельных векторов уменьшает вероятность рекомбинационных событий, которые могли бы привести к образованию репликационно-компетентных вирусов. В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть использован один плазмидный вектор, имеющий все ретровирусные компоненты.

[0374] В некоторых вариантах осуществления изобретения ретровирусные векторные частицы, в частности, лентивирусные векторные частицы, псевдотипируют для повышения эффективности трансдукции клеток-хозяев. Например, частица ретровирусных векторов, такая как частица лентивирусного вектора, в некоторых вариантах осуществления изобретения псевдотипируют с гликопротеином VSV-G, который обеспечивает широкий диапазон используемых клеток-хозяев, происходящих от типов клеток, которые могут быть трансдуцированы. В некоторых вариантах осуществления линию упаковывающих клеток трансфицируют плазмидой или полинуклеотидом, кодирующим не-нативный гликопротеин оболочки, такой как гликопротеин ксенотропной, политропной или амфотропной оболочки, как оболочки вируса синдбис, GALV или VSV-G.

[0375] В некоторых вариантах осуществления изобретения линия упаковывающих клеток обеспечивает компоненты, включая вирусные регуляторные и структурные белки, которые необходимы для доставки и упаковки вирусной геномной РНК в частицы

лентивирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления изобретения линия упаковывающих клеток может быть любой клеточной линией, которая способна экспрессировать лентивирусные белки и продуцировать функциональные частицы лентивирусного вектора. В некоторых аспектах подходящие линии упаковывающих клеток включают клетки линий 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).

[0376] В некоторых вариантах осуществления изобретения линия упаковывающих клеток стабильно экспрессирует вирусный белок (белки). Например, в некоторых аспектах можно сконструировать линию упаковывающих клеток, содержащую gag, pol, rev и/или другие структурные гены, но без LTR и упаковочных компонентов. В некоторых вариантах осуществления изобретения линия упаковывающих клеток может быть транзиентно трансфицирована молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими один или несколько вирусных белков, вместе с геномом вирусного вектора, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок, и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую гликопротеин оболочки.

[0377] В некоторых вариантах осуществления изобретения вирусные векторы и упаковывающие и/или хелперные плазмиды вводят путем трансфекции или инфекции в линию упаковывающих клеток. Линия упаковывающих клеток продуцирует вирусные векторные частицы, которые содержат геном вирусного вектора. Способы трансфекции или инфекции хорошо известны. Неограничивающие примеры включают способы с использованием фосфата кальция, DEAE-декстрана и способы липофекции, электропорации и микроинъекции.

[0378] Когда рекомбинантную плазмиду и ретровирусные LTR и упаковывающие последовательности вводят в специальную клеточную линию (например, путем преципитации с фосфатом кальция), упаковывающие последовательности позволяют РНК-транскрипту рекомбинантной плазмиды упаковываться в вирусные частицы, которые затем могут секретироваться в культуральную среду. В некоторых вариантах осуществления изобретения среды, содержащие рекомбинантные ретровирусы, собирают, необязательно концентрируют и используют для переноса генов. Например, в некоторых аспектах изобретения частицы вирусного вектора после котрансфекции упаковывающих плазмид и вектора переноса в линию упаковывающих клеток извлекают из культуральной среды и титруют стандартными методами, известными специалистами в данной области.

[0379] В некоторых вариантах осуществления изобретения ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, может быть получен в линии упаковывающих клеток, такой как типовая клеточная линия HEK 293T, путем введения плазмид для получения лентивирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления изобретения упаковывающую клетку трансфицируют и/или она содержит полинуклеотид, кодирующий gag и pol, и полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, такой как рецептор антигена, например CAR. В некоторых вариантах осуществления

изобретения линия упаковывающих клеток необязательно и/или дополнительно трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий белок rev. В некоторых вариантах осуществления изобретения линия упаковывающих клеток необязательно и/или дополнительно трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий неприродный гликопротеин оболочки, такой как VSV-g. В некоторых таких вариантах осуществления, приблизительно через два дня после трансфекции клеток, например, клеток HEK 293T, клеточный супернатант содержит рекомбинантные лентивирусные векторы, которые можно выделить и титровать.

[0380] Извлеченные и/или полученные частицы ретровирусных векторов можно использовать для трансдукции клеток-мишеней с использованием описанных способов. В клетках-мишенях вирусная РНК обратно транскрибируется, импортируется в ядро и стабильно интегрируется в геном хозяина. Через один или два дня после интеграции вирусной РНК можно обнаружить экспрессию рекомбинантного белка, например, рецептора антигена, такого как CAR.

2. Невирусные векторы

[0381] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки путем электропорации (см. например, Chicaybam et al, (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 and Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). В некоторых вариантах осуществления изобретения 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 использованием фосфата кальция (например, как описано в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York. NY), слияние протопластов, трансфекцию с использованием катионных липосом; бомбардировку микрочастицами с помощью частиц вольфрама (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); и совместную преципитацию ДНК с использованием фосфата стронция (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7:2031-2034 (1987)).

[0382] Другими подходами и векторами для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, являются те, которые описаны, например, в международной патентной заявке WO 2014055668 и в патенте США US 7446190.

[0383] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки с помощью транспозонов. Транспозоны (транспозируемые элементы) являются мобильными сегментами ДНК, которые могут перемещаться в геномах от одного локуса к другому. Эти элементы перемещаются через консервативный механизм «разреза и вставки». Транспозаза катализирует удаление транспозона из своего исходного местоположения в геноме и способствует его реинтеграции в другом месте. Могут быть использованы элементы с дефицитом транспозазы, если транспозаза поддерживается другим геном транспозазы. Таким образом, транспозоны можно использовать для включения чужеродной ДНК в геном

хозяина без использования системы трансдукции вируса. Примеры транспозонов, подходящих для применения с клетками млекопитающих, например, первичными лейкоцитами человека, включают, без ограничения, Sleeping Beauty и Piggybac.

[0384] Трансфекция на основе транспозона представляет собой двухкомпонентную систему, состоящую из транспозазы и транспозона. В некоторых вариантах осуществления изобретения система включает транспозон, сконструированный таким образом, чтобы он содержал чужеродную ДНК (также называемую в настоящем описании как ДНК-груз), например ген, кодирующий рекомбинантный рецептор, который фланкирован последовательностями инвертированных повторов/прямых повторов (IR/DR), которые распознаются сопровождающей транспозазой. В некоторых вариантах осуществления невирусная плазмида кодирует транспозазу под контролем промотора. Трансфекция плазмиды в клетку-хозяина приводит к транзиентной экспрессии транспозазы, и, таким образом, в течение начального периода после трансфекции транспозаза экспрессируется на достаточно уровнях для интеграции транспозона в геномную ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения сама транспозаза не интегрирована в геномную ДНК, и поэтому экспрессия транспозазы уменьшается с течением времени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия транспозазы клеткой-хозяином происходит на уровнях, достаточных для интеграции соответствующего транспозона в течение временит, равного менее приблизительно 4 часам, менее приблизительно 8 часам, менее приблизительно 12 часам, менее приблизительно 24 часам, менее приблизительно 2 дня, менее приблизительно 3 дня, менее приблизительно 4 дня, менее приблизительно 5 дней, менее приблизительно 6 дней, менее приблизительно 7 дней, менее приблизительно 2 недель, менее приблизительно 3 недель, менее приблизительно 4 недель, менее приблизительно 6 недель или менее приблизительно 8 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ДНК-груз, которая введена в геном хозяина, впоследствии не удаляют из генома хозяина по меньшей мере потому, что введенная доза не позволяет экспрессировать эндогенную транспозазу, способную вырезать ДНК-груз.

[0385] Sleeping Beauty (SB) является синтетическим членом суперсемейства транспозонов Tc1/mariner, реконструированных из неактивных элементов, содержащихся в геноме лососевых рыб. Трансфекция на основе SB-транспозона представляет собой двухкомпонентную систему, состоящую из транспозазы и транспозона, содержащего последовательности инвертированных повторов/прямых повторов (IR/DR), которые приводят к точной интеграции в динуклеотид TA. Транспозон разрабатывается вместе с представляющей интерес экспрессионной кассетой, фланкированной IR/DR. Транспозаза SB связывается со специфическими сайтами связывания, которые расположены в IR транспозона Sleeping Beauty. Транспозаза SB опосредует интеграцию транспозона, мобильного элемента, кодирующего последовательность-груз, фланкированную с обеих сторон инвертированными концевыми повторами, которые содержат сайты связывания для каталитического фермента (SB). Стабильная экспрессия возникает, когда SB вставляет

последовательности генов в хромосомы позвоночных в динуклеотид-мишень TA посредством механизма вырезания и вставки. Эта система использовалась для конструирования ряда типов клеток позвоночных, включая первичные лейкоциты периферической крови человека. В некоторых вариантах осуществления клетки контактируют, инкубируют и/или обрабатывают транспозоном SB, содержащим ген-груз, например ген, кодирующий рекомбинантный рецептор или CAR, фланкированный последовательностями IR SB. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки, подвергаемые трансфекции, приводят в контакт, инкубируют и/или обрабатывают плазмидой, включающей транспозон SB, содержащий ген-груз, например ген, кодирующий CAR, фланкированный последовательностями IR SB. В некоторых вариантах осуществления плазмида содержит, кроме того, кодирующий транспозазу SB ген, который не фланкирован последовательностями IR SB.

[0386] PiggyBac (PB) представляет собой другую систему транспозонов, которая может использоваться для интеграции ДНК-груза в геномную ДНК хозяина, например человека. Транспозаза PB распознает специфические для транспозона PB последовательности инвертированных концевых повторов (ITR), расположенные на обоих концах транспозона, и эффективно перемещает содержимое из исходных сайтов и эффективно интегрирует их в хромосомные сайты TTAA. Система транспозонов PB позволяет представляющим интерес геном, расположенным между двумя ITR в векторе PB, быть подвижными в геномах-мишенях. Система PB использовалась для конструирования ряда типов клеток позвоночных, включая первичные клетки человека. В некоторых вариантах осуществления клетки, подвергаемые трансфекции, приводят в контакт, инкубируют и/или обрабатывают транспозоном PB, содержащим ген-груз, например ген, кодирующий CAR, фланкированный последовательностями IR PB. В конкретных вариантах осуществления клетки, подвергаемые трансфекции, приводят в контакт, инкубируют и/или обрабатывают плазмидой, включающей транспозон PB, содержащий ген-груз, например кодирующий CAR ген, фланкированный последовательностями IR PB. В некоторых вариантах осуществления плазмида содержит, кроме того, кодирующий транспозазу PB ген, который не фланкирован последовательностями IR PB.

[0387] В некоторых вариантах осуществления изобретения различные элементы транспозона/транспозазы, используемые в рассматриваемых способах, например вектор SB или вектор PB, могут быть получены стандартными методами расщепления рестрикционным ферментом, лигированием и молекулярным клонированием. Один протокол для конструирования рассматриваемых векторов включает следующие стадии. Сначала очищенные фрагменты нуклеиновой кислоты, содержащие необходимые нуклеотидные последовательности компонентов, а также другие вспомогательные последовательности, расщепляют рестрикционными эндонуклеазами из исходных источников, например вектором, содержащим ген транспозазы. Фрагменты, содержащие желаемые нуклеотидные последовательности, отделяют от нежелательных фрагментов

различного размера с использованием традиционных методов разделения, например, с помощью электрофореза в агарозном геле. Желаемые фрагменты вырезают из геля и лигируют друг с другом в подходящей конфигурации так, чтобы была получена кольцевая нуклеиновая кислота или плазмида, содержащая желаемые последовательности, например последовательности, соответствующие различным элементам указанных выше векторов, как описано выше. Если это желательно, то сконструированные таким образом кольцевые молекулы затем амплифицируют в прокариотическом хозяине, например в E.coli. Процедуры расщепления, конструирования плазмиды, трансформации клеток и продуцирования плазмиды, используемые на этих стадиях, хорошо известны специалисту в данной области, и ферменты, необходимые для рестрикции и лигирования, коммерчески доступны. См. например, R. Wu, Ed., Methods in Enzymology, Vol. 68, Academic Press, N.Y. (1979); T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); Catalog 1982-83, New England Biolabs, Inc.; Catalog 1982-83, Bethesda Research Laboratories, Inc. Пример конструирования векторов, используемых в этих способах, представлен ниже в экспериментальной части, В WO 98/40510 и WO 99/25817 также описан также способ получения репрезентативной системы транспозонов Sleeping Beauty.

[0388] В некоторых вариантах осуществления изобретения трансдукцию с транспозонами осуществляют с помощью плазмиды, которая содержит ген транспозазы, и плазмиды, которая содержит транспозон, который содержит последовательность ДНК-груза, которая фланкирована последовательностями инвертированных повторов/прямых повторов (IR/DR), которые распознаются транспозазой. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК-груза кодирует гетерологичный белок, например рекомбинантный Т-клеточный рецептор или CAR. В некоторых вариантах осуществления плазмида включает транспозазу и транспозон. В некоторых вариантах осуществления транспозаза находится под контролем убиквитарного промотора или любого промотора, подходящего для управления экспрессией транспозазы в клетке-мишени. Убиквитарные (повсеместно распространенные) промоторы включают, но без ограничения ими, EFla, CMB, SV40, PGK1, Ubc, β-актин человека, CAG, TRE, UAS, Ac5, CaMKIIa и U6. В некоторых вариантах осуществления ДНК-груз содержит селективную кассету, позволяющую отбирать клетки со стабильной интеграцией ДНК-груза в геномную ДНК. Подходящие селективные кассеты включают, но без ограничения ими, селективные кассеты, кодирующие ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к спектиномицину, ген устойчивости к стрептомицину, ген устойчивости к ампициллину, ген устойчивости к карбенициллину, ген устойчивости к гигромицину, ген устойчивости к блеомицину, ген устойчивости к эритромицину и ген устойчивости к полимиксину В.

[0389] В некоторых вариантах осуществления компоненты для трансдукции с помощью транспозона, например, плазмиды, содержащие транспозазу SB и транспозон SB, вводят в клетку-мишень. Может использоваться любой удобный протокол, в котором может предусматриваться введение компонентов системы in vitro или in vivo в клетку-

мишень, в зависимости от местонахождения клетки-мишени. Например, если клетка-мишень представляет собой выделенную клетку, система может вводиться непосредственно в клетку в условиях культивирования клеток, допускающих жизнеспособность клетки-мишени, например, с использованием стандартных методов трансформации. Такие методы включают без ограничения: инфицирование вирусами, трансформацию, конъюгацию, слияние протопластов, электропорацию, технологию генной пушки, преципитацию с использованием фосфата кальция, прямую микроинъекцию, доставку вирусного вектора и т.п. Выбор метода, как правило, зависит от типа трансформируемой клетки и обстоятельств, при которых происходит трансформация (т.е. in vitro, ex vivo или in vivo). Общее описание этих методов можно найти в Ausubel, et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3-е изд., Wiley & Sons, 1995.

[0390] В некоторых вариантах осуществления транспозон SB и источник транспозазы SB вводятся в клетку-мишень многоклеточного организма, например млекопитающего или человека, в условиях, достаточных для вырезания фланкированной инвертированными повторами нуклеиновой кислоты из вектора, несущего транспозон, и последующей интеграции вырезанной нуклеиновой кислоты в геном клетки-мишени. Некоторые варианты осуществления включают, кроме того, стадию обеспечения того, что требуемая транспозазная активность присутствует в клетке-мишени вместе с введенным транспозоном. В зависимости от структуры самого вектора с транспозоном, т.е. того, включает ли вектор область, кодирующую продукт, обладающий транспозазной активностью, способ может включать, кроме того, введение в клетку-мишень второго вектора, который кодирует требуемую транспозазную активность.

[0391] В некоторых вариантах осуществления количество векторной нуклеиновой кислоты, включающей транспозон, и количество векторной нуклеиновой кислоты, кодирующей транспозазу, которая вводится в клетку, является достаточным для обеспечения желательного вырезания и вставки нуклеиновой кислоты транспозона в геном клетки-мишени. По сути, количество введенной векторной нуклеиновой кислоты должно обеспечивать достаточную степень транспозазной активности и достаточное число копий нуклеиновой кислоты, которое желательно вставить в клетку-мишень. Количество векторной нуклеиновой кислоты, которая вводится в клетку-мишень, изменяется в зависимости от эффективности конкретного применяемого протокола введения, например, конкретного применяемого протокола введения ex vivo.

[0392] После того, как векторная ДНК проникла в клетку-мишень в комбинации с требуемой транспозазой, область нуклеиновой кислоты вектора, которая фланкирована инвертированными повторами, т.е. векторная нуклеиновая кислота, расположенная между распознаваемыми транспозазой Sleeping Beauty инвертированными повторами, вырезается из вектора с помощью предоставленной транспозазы и вставляется в геном клетки-мишени. По сути, введение векторной ДНК в клетку-мишень сопровождается последующим опосредованным транспозазой вырезанием и вставкой экзогенной нуклеиновой кислоты, переносимой вектором, в геном клетки-мишени. В конкретных

вариантах осуществления изобретения вектор интегрируется в геномы по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15% или по меньшей мере 20% клеток, которые трансфицируются транспозоном SB и/или транспозазой SB. В некоторых вариантах осуществления интеграция нуклеиновой кислоты в геном клетки-мишени является стабильной, т.е. векторная нуклеиновая кислота остается в геноме клетки-мишени в течение более чем переходного периода времени и передается на части хромосомного генетического материала потомству клетки-мишени.

[0393] В некоторых вариантах осуществления транспозоны используются для интеграции нуклеиновых кислот, т.е. полинуклеотидов, различных размеров в геном клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления размер ДНК, которая вставляется в геном клетки-мишени с использованием рассматриваемых способов, находится в диапазоне от или приблизительно от 0,1 т.п.н. до или приблизительно до 200 т.п.н., от или приблизительно от 0,5 т.п.н. до или приблизительно до 100 т.п.н., от или приблизительно от 1,0 т.п.н. до или приблизительно до 8,0 т.п.н., от или приблизительно от 1,0 до или приблизительно до 200 т.п.н., от или приблизительно от 1,0 до или приблизительно до 10 т.п.н., от или приблизительно от 10 т.п.н. до или приблизительно до 50 т.п.н., от или приблизительно от 50 т.п.н. до или приблизительно до 100 т.п.н. или от или приблизительно от 100 т.п.н. до или приблизительно до 200 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер ДНК, которая вставляется в геном клетки-мишени с использованием рассматриваемых способов, находится в диапазоне от или приблизительно от 1,0 т.п.н. до или приблизительно до 8,0 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления размер ДНК, которая вставляется в геном клетки-мишени с использованием рассматриваемых способов, находится в диапазоне от или приблизительно от 1,0 до или приблизительно до 200 т.п.н. В конкретных вариантах осуществления размер ДНК, которая вставляется в геном клетки-мишени с использованием рассматриваемых способов, находится в диапазоне от или приблизительно от 1,0 т.п.н. до или приблизительно до 8,0 т.п.н.

D Культивирование и/или размножение клеток

[0394] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложенные способы включают одну или несколько стадий культивирования клеток, например, путем культивирования клеток в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению. В некоторых вариантах осуществления клетки, например сконструированные CD4+ и CD8+ Т-клетки, культивируют в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению после конструирования клеток методами генной инженерии, например, путем введения рекомбинантного полипептида в клетки путем трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки культивируют после инкубирования клеток в условиях стимуляции и/или после того, как клетки трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным

полинуклеотидом, например полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления культивирование приводит к получению культивированных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование приводит к получению культивированной композиции, например, композицию культивированных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько стадий обработки включают стадию стимулирования выделенных клеток, таких как выбранных клеточных популяций. Инкубация может быть выполнена до или во время стадии конструирования, например, методами генной инженерии, в частности, трансдукцией, как описано здесь в Разделе I-C. В некоторых вариантах осуществления стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток, например, до трансдукции.

[0395] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки и/или композиции сконструированных Т-клеток культивируют, например, в условиях, которые способствуют размножению и/или пролиферации, до сбора и приготовления конечной композиции клеток, например, способом, представленным здесь, например, в Разделе I-E. В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют после того, как клетки были сконструированы, трансдуцированы и/или трансфицированы, например, любым из способов, представленных в настоящем документе, например, в Разделе I-C. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные композиции предварительно криогенно замораживают, хранят и оттаивают перед культивированием.

[0396] В некоторых вариантах осуществления композицию клеток культивируют. В конкретных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 65%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 98%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% клеток композиции представляют собой CD3+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 65%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 98%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей

мере 99%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99,9% или 100% или приблизительно 100% клеток композиции представляют собой CD4+ или CD8+ Т-клетки.

[0397] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивируют по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90% или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95% клеток, которые были подвергнуты конструированию, трансфекции и/или трансдукции. В конкретных вариантах осуществления изобретения культивируют все или приблизительно всех клетки, которые были подвергнуты конструированию, трансфекции и/или трансдукции.

[0398] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, например сконструированные клетки, культивируют в среде, объем которой равен, приблизительно равен, или по меньшей мере равен 100 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл, 1000 мл, 1200 мл, 1400 мл, 1600 мл, 1800 мл, 2000 мл, 2200 мл или 2400 мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки культивируют в начальном объеме, который впоследствии доводят до другого объема. В конкретных вариантах осуществления изобретения объем впоследствии регулируют во время культивирования. В конкретных вариантах осуществления изобретения объем увеличивают по сравнению с исходным объемом во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения объем увеличивают, когда клетки достигают заданной плотности во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения начальный объем равен или составляет приблизительно 500 мл. В конкретных вариантах осуществления изобретения объем увеличивают от исходного объема, когда клетки достигают заданной плотности или концентрации во время культивирования. В конкретных вариантах осуществления изобретения объем увеличивают, когда клетки достигают плотности и/или концентрации, составляющей приблизительно или по меньшей мере приблизительно $0,1 \times 10^6$ клеток/мл, $0,2 \times 10^6$ клеток/мл, $0,4 \times 10^6$ клеток/мл, $0,6 \times 10^6$ клеток/мл, $0,8 \times 10^6$ клеток/мл, 1×10^6 клеток/мл, $1,2 \times 10^6$ клеток/мл, $1,4 \times 10^6$ клеток/мл, $1,6 \times 10^6$ клеток/мл, $1,8 \times 10^6$ клеток/мл, $2,0 \times 10^6$ клеток/мл, $2,5 \times 10^6$ клеток/мл, $3,0 \times 10^6$ клеток/мл, $3,5 \times 10^6$ клеток/мл, $4,0 \times 10^6$ клеток/мл, $4,5 \times 10^6$ клеток/мл, $5\ 0 \times 10^6$ клеток/мл, 6×10^6 клеток/мл, 8×10^6 клеток/мл или 10×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения плотность и/или концентрация относится к жизнеспособными клетками в культуре. В некоторых вариантах осуществления изобретения объем увеличивают от исходного объема, когда клетки достигают плотности и/или концентрации равной, равной или по меньшей мере приблизительно равной $0,6 \times 10^6$ клеток/мл.

[0400] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки достигают заданной плотности и/или концентрации, и объем увеличивают на, приблизительно на, или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 100 мл, 200 мл, 300 мл, 400

мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл, 1000 мл, 1200 мл, 1400 мл, 1600 мл, 1800 мл, 2000 мл, 2200 мл или 2400 мл. В некоторых вариантах объем увеличивают на 500 мл. В конкретных вариантах осуществления объем увеличивают на, приблизительно на, или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл, 1000 мл, 1200 мл, 1400 мл, 1600 мл, 1800 мл, 2000 мл, 2200 мл или 2400 мл. В некоторых вариантах объем увеличивают до объема 1000 мл. В некоторых вариантах осуществления объем увеличивают на, приблизительно на, или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 5 мл, 10 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 75 мл, 80 мл, 90 мл или 100 мл, каждую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 минут. В некоторых вариантах осуществления скорость увеличения объема равна или приблизительно равна 50 мл за каждые 8 минут.

[0401] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, например сконструированные клетки, сначала культивируют в объеме 500 мл. В конкретных вариантах осуществления изобретения объем увеличивают до 1000 мл, когда клетки во время культивирования достигают плотности или концентрации $0,6 \times 10^6$ клеток/мл.

[0402] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование проводят в бессывороточных средах. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда представляет собой известную и/или хорошо известную среду для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда представляет собой контролируемую культуральную среду, которая была обработана, например, отфильтрована для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит белки. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда может содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы присоединения.

[0403] В некоторых вариантах изобретения предложенные способы используются со стадией культивирования клеток в условиях, которые способствуют размножению и/или пролиферации. Такие условия включают те, которые предназначены для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для примирования клеток для генной инженерии, в частности, для введения рекомбинантного антигена-рецептора.

[0404] В некоторых вариантах осуществления изобретения условия культивирования могут включать одно или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, агентов, например питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры связывания, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток.

[0405] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток после культивирования и/или сразу после культивирования. В некоторых вариантах осуществления стимулирующее средство

удаляют и/или отделяют от клеток после и/или сразу после культивирования, до приготовления конечной композиции клеток, например, приготовления выходной композиции культивируемых выходных клеток. В некоторых вариантах осуществления стимулирующим реагентом является стимулирующий реагент, который описан в настоящем документе, например, в Разделе I-B-1. В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток, как описано в настоящем документе, например, в Разделе I-B-2.

[0406] Условия могут включать одно или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, агентов, например питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры связывания, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток.

[0407] В некоторых аспектах изобретения инкубирование проводят в соответствии с методиками, описанными в патенте США US 6040177 (Riddell et al.) в публикациях 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.

[0408] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере часть культивирования проводят во внутренней полости центрифужной камеры, например, при центробежном вращении, как описано в международной публикации WO 2016/073602. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубирования, выполняемой в центрифужной камере, включает смешивание с реагентом или реагентами для индукции стимуляции и/или активации. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, такие как отбранные клетки, смешивают со стимулирующим веществом или стимулирующим агентом в центрифужной камере. В некоторых вариантах таких процессов определенный объем клеток смешивают с определенным количеством одного или нескольких стимулирующих агентов, количество которых значительно меньше, чем обычно используют при осуществлении аналогичных стимуляций в клеточной культуре в планшетах или в других системах.

[0409] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующее средство добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое значительно меньше (например, не более 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80%) по сравнению с количеством стимулирующего агента, которое обычно используют, или которое необходимо для достижения такой же или подобной эффективности отбора одного и того же количества клеток или того же объема клеток, когда отбор осуществляют без смешивания в камера центрифуги, например, в пробирке или мешке с периодическим встряхиванием или вращением. В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование проводят при добавлении к клеткам и стимулирующему агенту буферного раствора для культивирования, для достижения целевого объема, составляющего, например, от 10 мл до 2000 мл, в частности, приблизительно, по меньшей

мере или приблизительно по меньшей мере 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 150 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл, 1000 мл, 1200 мл, 1400 мл, 1600 мл, 1800 мл, 21000 мл, 2200 мл или 2400 мл. В некоторых вариантах осуществления инкубационный буфер и стимулирующий агент предварительно смешивают перед добавлением к клеткам. В некоторых вариантах осуществления инкубационный буфер и стимулирующий агент добавляют по отдельности к клеткам. В некоторых вариантах стимулирующее инкубирование проводят в условиях периодического небольшого перемешивания, которое способствует энергетически благоприятным взаимодействиям и, таким образом, позволяют использовать меньшее общее количество стимулирующего средства для достижения стимуляции и активации клеток.

[0410] В некоторых вариантах осуществления изобретения инкубирование обычно проводят в условиях перемешивания, таких как при вращательное перемешивание, обычно при относительно низкой силе или скорости, где скорость ниже, чем скорость, используемая для осаждения клеток, например, от или от приблизительно 600 об/мин до или приблизительно до 1700 об/мин (например, от или приблизительно от, или по меньшей мере от 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин или 1700 об/мин), например, при RCF в образце или у стенки камеры или другой емкости, от или приблизительно от 80 g до 100 g (например, при, приблизительно при или по меньшей мере при 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах центрифугирование выполняют с использованием повторяющихся периодов вращения при низкой скорости с последующим периодом покоя, такими как вращение и/или покой в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, при вращении в течение приблизительно 1 или 2 секунд с последующим периодом покоя приблизительно в течение 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0411] В некоторых вариантах осуществления изобретения общая продолжительность инкубирования, например, со стимулирующим агентом, составляет или приблизительно составляет от 1 часа до 96 часов, от 1 часа до 72 часов, от 1 часа до 48 часов, от 4 часов до 36 часов, от 8 часов до 30 часов или от 12 часов до 24 часов, например, по меньшей мере, или приблизительно по меньшей мере 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов или 72 часа. В некоторых вариантах дополнительная инкубация проводится в течение периода времени равного или приблизительно равного 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 включительно.

[0412] В конкретных вариантах осуществления изобретения композицию обогащенных Т-клеток культивируют в присутствии одного или нескольких цитокинов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько цитокинов являются рекомбинантными цитокинами. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины человека. В некоторых вариантах осуществления один или несколько цитокинов связываются и/или способны связываться с рецепторами, которые экспрессируются и/или являются

эндогенными по отношению к Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают член семейства 4-альфа-спиральных пучков цитокинов. В некоторых вариантах осуществления члены семейства 4-альфа-спирали цитокинов включают, без ограничения, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-15. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-7. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный IL-2.

[0413] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, например, сконструированные клетки, культивируют в присутствии цитокина, например, рекомбинантного цитокина человека, при концентрации равной или приблизительно равной от 1 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл или от 100 МЕ/мл до 1500 МЕ/мл.

[0414] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, например, сконструированные клетки, культивируют с IL-2, например, рекомбинантный IL-2 человека, при концентрации равной или приблизительно равной от 1 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 400 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 300 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 250 МЕ/мл, от 150 МЕ/мл до 300 МЕ/мл, от 200 МЕ/мл до 400 МЕ/мл, или от 150 МЕ/мл до 300 МЕ/мл, например, в бессывороточной среде. В конкретных вариантах осуществления изобретения, клетки, например, клетки входной композиции, инкубируют с рекомбинантным IL-2 при концентрации, равной, приблизительно равной или по меньшей мере приблизительно равной 100 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 140 МЕ/мл, 160 МЕ/мл, 180 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 220 МЕ/мл, 240 МЕ/мл, 260 МЕ/мл, 280 МЕ/мл, 300 МЕ/мл, 320 МЕ/мл, 340 МЕ/мл, 360 МЕ/мл, 380 МЕ/мл или 400 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления клетки, например, входные клетки, культивируют в присутствии рекомбинантного IL-2, например рекомбинантного IL-2 человека в количестве равном или приблизительно равном 200 МЕ/мл.

[0415] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, например, сконструированные клетки, культивируют с IL-7, например, с рекомбинантным IL-7 человека, при концентрации равной или приблизительно равной от 100 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 1500 МЕ/мл, от 600 МЕ/мл до 1200 МЕ/мл, от 800 МЕ/мл до 1600 МЕ/мл, от 900 МЕ/мл до 1800 МЕ/мл, или от 1000 МЕ/мл до 1500 МЕ/мл, например, в бессывороточной среде. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки, например, сконструированные клетки, инкубируют с IL-7 при концентрации равной, приблизительно равной или по меньшей мере приблизительно равной 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, 1600 МЕ/мл, 1800 МЕ/мл, 2000 МЕ/мл, 2200 МЕ/мл или 2400 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления клетки, например, сконструированные клетки культивируют в присутствии IL-7 в количестве равном или приблизительно равном 1200 МЕ/мл.

[0416] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, например, сконструированные клетки, культивируют с IL-15, например, с рекомбинантным IL-15 человека, при концентрации равной или приблизительно равной от 1 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 400 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 300 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 250 МЕ/мл, от 150 МЕ/мл до 300 МЕ/мл, от 200 МЕ/мл до 400 МЕ/мл, или от 150 МЕ/мл до 150 МЕ/мл, например, в бессывороточной среде. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки, например, клетки сконструированной композиции, инкубируют с рекомбинантным IL-15 при концентрации равной, приблизительно равной или по меньшей мере приблизительно равной 100 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 140 МЕ/мл, 160 МЕ/мл, 180 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 220 МЕ/мл, 240 МЕ/мл, 260 МЕ/мл, 280 МЕ/мл, 300 МЕ/мл, 320 МЕ/мл, 340 МЕ/мл, 360 МЕ/мл, 380 МЕ/мл или 400 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления клетки, например, сконструированные Т-клетки, культивируют в присутствии IL-15, например рекомбинантного человеческого IL-15 7 в количестве равном или приблизительно равном 200 МЕ/мл.

[0417] В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки, например сконструированные клетки и/или клетки из сконструированной композиции, культивируют в присутствии IL-2, IL-7 и/или IL-15, например, в бессывороточной среде. В некоторых вариантах IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются рекомбинантными. В некоторых вариантах IL-2, IL-7 и/или IL-15 представляют собой интерлейкины человека. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный IL-2, IL-7 и/или IL-15 человека. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии рекомбинантных IL-2, IL-7 и IL-15.

[0418] В конкретных вариантах осуществления изобретения культивирование осуществляют в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят в закрытой системе в стерильных условиях. В конкретных вариантах осуществления изобретения культивирование осуществляют в той же закрытой системе, в которой проводились и одна или несколько стадий, проводимых в системе. В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию обогащенных Т-клеток удаляют из закрытой системы и помещают в биореактор и/или соединяют с ним для культивирования. Примеры подходящих биореакторов для культивирования включают, без ограничения, биореакторы GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20/50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems и Pall XRS Bioreactor Systems. В некоторых вариантах биореактор используют для перфузии и/или смешивания клеток во время по меньшей мере части стадии культивирования.

[0419] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивируемые клетки, находящиеся в биореакторе или в системе, соединенной и/или контролируемой

биореактором, размножаются во время культивирования более быстро, чем клетки, культивируемые без биореактора, например как клетки, которые культивируются в статических условиях, например, без смешивания, перекачивания, движения и/или перфузии. В некоторых вариантах осуществления изобретения культивируемые клетки, находящиеся в биореакторе или в системе, соединенной и/или контролируемой биореактором, достигают порогового уровня размножения, количества клеток, концентрации и/или плотности в течение 21 дня, 14 дней, 10 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов или 12 часов. В некоторых вариантах осуществления изобретения культивируемые клетки, находящиеся в биореакторе или в системе, соединенной и/или контролируемой биореактором, достигают порогового уровня размножения, количества клеток, концентрации и/или плотности в период времени, который приблизительно или по меньшей мере приблизительно на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90%, на 95%, на 100%, на 150%, или достигают этих показателей за период времени, который по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно или 5-кратно меньший, чем для клеток, культивируемых в аналогичном и/или альтернативном способе, где культивируемые клетки не находятся в биореакторе или в системе, соединенной и/или контролируемой биореактором.

[0420] В некоторых вариантах осуществления изобретения смешивание происходит в условиях качания и/или вращательного перемешивания, или включает их. В некоторых случаях биореактор может подвергаться раскачиванию и/или вращению, что в некоторых аспектах увеличивает перенос кислорода. Качание и/или вращательное перемешивание может включать, без ограничения, вращение вдоль горизонтальной оси, вращение вдоль вертикальной оси, качательное движение вдоль наклонной оси или вдоль наклонной горизонтальной оси биореактора или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубирования проводят в условиях качания. Скорость качания и угол качания можно регулировать для достижения требуемого уровня перемешивания. В некоторых вариантах осуществления угол качания составляет 20°, 19°, 18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2° или 1°. В некоторых вариантах осуществления угол качания находится в диапазоне от 6 до 16°. В других вариантах осуществления угол качания находится в диапазоне от 7 до 16°. В других вариантах осуществления угол качания составляет от 8 до 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 или 40 об/мин. В некоторых вариантах осуществления изобретения скорость качания составляет от 4 до 12 об/мин, например от 4 до 6 об/мин включительно.

[0421] В некоторых вариантах осуществления изобретения в биореакторе поддерживают температуру 37°C или приблизительно 37°C при содержании CO_2 на уровне или приблизительно на уровне 5% с постоянным потоком воздуха со скоростью равной, приблизительно равной, по меньшей мере равной или приблизительно по

меньшей мере равной 0,01 л/мин, 0,05 л/мин, 0,1 л/мин, 0,2 л/мин, 0,3 л/мин, 0,4 л/мин, 0,5 л/мин, 1,0 л/мин, 1,5 л/мин или 2,0 л/мин, или более 2,0 л/мин. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере часть культивирования проводят при перфузии, например, со скоростью 750 мл/день и/или 1500 мл/день, например, в зависимости от времени от начала культивирования и/или плотности культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере часть стадии размножения культуры клеток выполняют с качанием при угле от 5° до 10°, например, при угле 6°, с постоянной скоростью качания, такой как от 5 до 15 об/мин, например, при скорости 6 или 10 об/мин.

[0422] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере часть стадии культивирования проводят при постоянной перфузии, например, перфузии с низкой постоянной скоростью. В некоторых вариантах осуществления перфузия представляет собой или включает выпуск жидкости, например, использованной среды, и приток свежей среды. В некоторых вариантах осуществления изобретения перфузия обеспечивает замену использованной среды на свежую среду. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере часть культивирования проводят при перфузии с постоянной скоростью, равной или приблизительно равной, или по меньшей мере равной или приблизительно по меньшей мере равной 10 мл/день, 200 мл/день, 250 мл/день, 275 мл/день, 290 мл/день, 300 мл/день, 350 мл/день, 400 мл/день, 500 мл/день, 550 мл/день, 575 мл/день, 580 мл/день, 600 мл/день, 650 мл/день, 700 мл/день, 750 мл/день, 800 мл/день, 850 мл/день, 900 мл/день, 950 мл/день, 1000 мл/день, 1100 мл/день, 1160 мл/день, 1200 мл/день, 1400 мл/день, 1500 мл/день, 1600 мл/день,1800 мл/день, 2000 мл/день, 2200 мл/день или 2400 мл/день.

[0423] В конкретных вариантах осуществления изобретения культивирование начинают в условиях без перфузии, и перфузию начинают после установленного и/или предварительно определенного периода времени, равного, приблизительно равного или по меньшей мере равного 12 часам, 24 часам, 36 часам, 48 часам, 60 часам, 72 часам, или более 72 часов после начала или инициирования культивирования. В конкретных вариантах осуществления изобретения перфузию начинают когда плотность или концентрация клеток достигает установленной или заданной плотности или концентрации. В некоторых вариантах осуществления изобретения перфузию начинают, когда культивируемые клетки достигают плотности или концентрации равной, или приблизительно равной, или по меньшей мере равной или приблизительно по меньшей мере равной 0,1 × 10^6 клеток/мл, 0,2 × 10^6 клеток/мл, 0,4 × 10^6 клеток/мл, 0,6 × 10^6 клеток/мл, 0,8 × 10^6 клеток/мл, 1 × 10^6 клеток/мл, 1,2 × 10^6 клеток/мл, 1,4 × 10^6 клеток/мл, 1,6 × 10^6 клеток/мл, 1,8 × 10^6 клеток/мл, 2,0 × 10^6 клеток/мл, 2,5 × 10^6 клеток/мл, 3,0 × 10^6 клеток/мл, 3,5 × 10^6 клеток/мл, 4,0 × 10^6 клеток/мл, 4,5 × 10^6 клеток/мл, 5 0 × 10^6 клеток/мл, 6 × 10^6 клеток/мл, 8 × 10^6 клеток/мл или 10 × 10^6 клеток/мл, или жизнеспособных клеток.

[0424] В конкретных вариантах осуществления изобретения перфузию во время культивирования осуществляют с различными скоростями. Например, в некоторых вариантах осуществления скорость перфузии зависит от плотности и/или концентрации культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения скорость перфузии увеличивают, когда клетки достигают установленной или заданной плотности или концентрации. Скорость перфузии может изменяться, например, в два раза, три раза, четыре раза, пять раз, более чем в пять раз, более чем в десять раз, более чем в 15 раз, более чем в 20 раз, более чем в 25 раз, более чем в 50 раз или более чем в 100 раз во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления постоянную скорость перфузии увеличивают, когда клетки достигают установленной или заданной плотности клеток или концентрации, равной или приблизительно равной, или по меньшей мере равной или приблизительно по меньшей мере равной $0,6 \times 10^6$ клеток/мл, $0,8 \times 10^6$ клеток/мл, 1×10^6 клеток/мл, $1,2 \times 10^6$ клеток/мл, $1,4 \times 10^6$ клеток/мл, $1,6 \times 10^6$ клеток/мл, $1,8 \times 10^6$ клеток/мл, $2,0 \times 10^6$ клеток/мл, $2,5 \times 10^6$ клеток/мл, $3,0 \times 10^6$ клеток/мл, $3,5 \times 10^6$ клеток/мл, $4,0 \times 10^6$ клеток/мл, $4,5 \times 10^6$ клеток/мл, $5,0 \times 10^6$ клеток/мл, 6×10^6 клеток/мл, 8×10^6 клеток/мл или 10×10^6 клеток/мл, или жизнеспособных клеток.

[0425] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование начинают в условиях без перфузии, и перфузию начинают, когда плотность или концентрация клеток достигает установленной или заданной плотности или концентрации. В некоторых вариантах осуществления перфузию начинают со скоростью, равной или приблизительно равной, или по меньшей мере равной или приблизительно по меньшей мере равной 100 мл/день, 200 мл/день, 250 мл/день, 275 мл/день, 290 мл/день, 300 мл/день, 350 мл/день, 400 мл/день, 450 мл/день, 500 мл/день, 550 мл/день, 575 мл/день, 580 мл/день, 600 мл/день, 650 мл/день700 мл/день, 750 мл/день, 800 мл/день, 850 мл/день, 900 мл/день, 950 мл/день, 1000 мл/день, 1100 мл/день, 1160 мл/день, 1200 мл/день, 1400 мл/день, 1600 мл/день, 1800 мл/день, 2000 мл/день, 2200 мл/день или 2400 мл/день, когда плотность или концентрация клеток достигает установленной или заданной плотности или концентрации. В некоторых вариантах осуществления изобретения перфузию начинают, когда культивируемые клетки достигают плотности или концентрации равной или приблизительно равной, или по меньшей мере равной или приблизительно по меньшей мере равной $0,1 \times 10^6$ клеток/мл, $0,2 \times 10^6$ клеток/мл, $0,4 \times 10^6$ клеток/мл, $0,6 \times 10^6$ клеток/мл, $0,8 \times 10^6$ клеток/мл, 1×10^6 клеток/мл, $1,2 \times 10^6$ клеток/мл, $1,4 \times 10^6$ клеток/мл, $1,6 \times 10^6$ клеток/мл, $1,8 \times 10^6$ клеток/мл, $2,0 \times 10^6$ клеток/мл, $2,5 \times 10^6$ клеток/мл, $3,0 \times 10^6$ клеток/мл, $3,5 \times 10^6$ клеток/мл, $4,0 \times 10^6$ клеток/мл, $4,5 \times 10^6$ клеток/мл, $5,0 \times 10^6$ клеток/мл, 6×10^6 клеток/мл, 8×10^6 клеток/мл или 10×10^6 клеток/мл, или жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления перфузию осуществляют, когда клетки культивируют в объеме равном или приблизительно равном, или по меньшей мере равном или приблизительно по меньшей мере равном 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл или 1000 мл. В некоторых вариантах объем составляет 1000 мл.

[0426] В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере часть стадии культивирования осуществляют с использованием перфузии с определенной скоростью, и скорость перфузии увеличивают на, приблизительно на, или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 100 мл/день, 200 мл/день, 250 мл/день, 275 мл/день, 290 мл/день, 300 мл/день, 350 мл/день, 400 мл/день, 450 мл/день, 500 мл/день, 550 мл/день, 575 мл/день, 580 мл/день, 600 мл/день, 650 мл/день, 700 мл/день, 750 мл/день, 800 мл/день, 850 мл/день, 900 мл/день, 950 мл/день, 1000 мл/день, 1100 мл/день, 1160 мл/день, 1200 мл/день, 1400 мл/день, 1600 мл/день, 1800 мл/день, 2000 мл/день, 2200 мл/день или на 2400 мл/день, когда плотность или концентрация клеток достигает установленной или заданной плотности или концентрации. В некоторых вариантах осуществления изобретения перфузию начинают, когда культивируемые клетки достигают плотности или концентрации равной или приблизительно равной, или по меньшей мере равной или приблизительно по меньшей мере равной $0,1 \times 10^6$ клеток/мл, $0,2 \times 10^6$ клеток/мл, $0,4 \times 10^6$ клеток/мл, $0,6 \times 10^6$ клеток/мл, $0,8 \times 10^6$ клеток/мл, 1×10^6 клеток/мл, $1,2 \times 10^6$ клеток/мл, $1,4 \times 10^6$ клеток/мл, $1,6 \times 10^6$ клеток/мл, $1,8 \times 10^6$ клеток/мл, $3,0 \times 10^6$ клеток/мл, $3,5 \times 10^6$ клеток/мл, $4,0 \times 10^6$ клеток/мл, $4,5 \times 10^6$ клеток/мл, $5,0 \times 10^6$ клеток/мл, 6×10^6 клеток/мл, 8×10^6 клеток/мл или 10×10^6 клеток/мл, или жизнеспособных клеток.

[0427] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование начинают в условиях без перфузии или перфузии с определенной скоростью, и скорость перфузии увеличивают до или приблизительно до 750 мл/день, когда плотность или концентрация клеток достигает концентрации, приблизительно равной или по меньшей мере равной $0,61 \times 10^6$ клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки перфузируют со скоростью, равной, приблизительно равной или по меньшей мере равной 750 мл/день, когда плотность или концентрация клеток достигает концентрации приблизительно равной или по меньшей мере равной $0,61 \times 10^6$ клеток/мл, когда клетки культивируют в объеме равном, приблизительно равном или по меньшей мере равном 1000 мл. В некоторых вариантах скорость перфузии увеличивают до или приблизительно до 1500 мл/день, когда плотность или концентрация клеток достигает концентрации равной, приблизительно равной или по меньшей мере равной 2×10^6 клеток/мл.

[0428] В некоторых аспектах изобретения культивирование с перфузией, например при высокой скорости перфузии, например, со скоростью равной или приблизительно равной, или по меньшей мере равной или приблизительно по меньшей мере равной 500 мл/день, 600 мл/день, 700 мл/день, 750 мл/день, 800 мл/день, 900 мл/день, 1000 мл/день, 1100 мл/день, 1200 мл/день, 1300 мл/день, 1400 мл/день, 1500 мл/день, 1600 мл/день, 1700 мл/день, 1800 мл/день, 1900 мл/день или 2000 мл/день, улучшает состояние клеток, их жизнеспособность, выживание, пролиферацию, размножение и/или функции клеток, такие как увеличение и/или оптимизация поступления питательных веществ в клетки, поддержание pH и/или минимизация присутствия клеточных отходов.

[0429] В некоторых аспектах изобретения культивирование с перфузией может улучшить удаление и/или приводить к снижению остатков технологических реагентов. В некоторых случаях остатки технологических реагентов могут мешать и/или усложнять интерпретацию анализов, измерений и/или тестов, которые выполняются во время или после процесса. Такие анализы могут включать, без ограничения, оценк стерильности, измерение эндотоксинов, остатков шариков, вирусной ДНК, например, репликационных компетентных вирусных ДНК, количества клеток, анализы жизнеспособности клеток, анализы состояния клеток и анализы клеточной активности. В некоторых вариантах осуществления изобретения более высокие скорости перфузии являются более выгодными для удаления остаточков технологических реагентов, чем более низкие скорости перфузии.

[0430] В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию обогащенных клеток культивируют в присутствии поверхностно-активного вещества. В конкретных вариантах осуществления изобретения такое культивирование клеток композиции уменьшает величину напряжения сдвига, которое может происходить во время культивирования, например, из-за смешивания, раскачивания, движения среды и/или перфузии. В некоторых вариантах осуществления изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой или включает агент, который снижает поверхностное натяжение жидкостей и/или твердых веществ. Например, поверхностно-активное вещество включает жирный спирт (например, стериловый спирт), полиоксиэтиленгликольоктилоктиловый эфир (например, Triton X-100) или полиоксиэтиленгликольсорбитаналкиловый эфир (например, полисорбат 20, 40, 60). В некоторых вариантах осуществления изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой или включает анионное поверхностно-активное вещество, катионное поверхностно-активное вещество, цвиттерионное поверхностно-активное вещество или неионное поверхностно-активное вещество, котолрое добавляют в среду. В некоторых вариантах поверхностно-активное вещество выбирают из группы, состоящей из полисорбата 80 (PS80), полисорбата 20 (PS20), полоксамера 188 (P188). В некоторых вариантах поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер, например полоксамер 188.

[0431] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование проводят при отсутствии поверхностно-активного вещества.

[0432] В конкретных вариантах осуществления изобретения культивирование заканчивают, когда клетки достигают порогового количества, концентрации и/или уровня размножения. В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование заканчивают, когда клетки достигают порогового суммарного количества клеток, например, порогового количества клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения пороговое значение количества клеток равно или приблизительно равно, или по меньшей мере равно или приблизительно по меньшей мере равно 50×10^6 клеток, 100×10^6 клеток, 200×10^6 клеток, 300×10^6 клеток, 400×10^6 клеток, 600×10^6 клеток, 800×10^6

клеток, 1000 × 10^6 клеток, 1200 × 10^6 клеток, 1400 × 10^6 клеток, 1600 × 10^6 клеток, 1800 × 10^6 клеток, 2000 × 10^6 клеток, 2500 × 10^6 клеток, 3000 × 10^6 клеток, 3500 × 10^6 клеток, 5000 × 10^6 клеток, 3500 × 10^6 клеток, 10000 × 10^6 клеток, 12000 × 10^6 клеток, 15000 × 10^6 клеток или 20000 × 10^6 клеток или жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения пороговое значение количества клеток равно или приблизительно равно, или по меньшей мере равно или приблизительно по меньшей мере равно 3500 × 10^6 клеток или 5500 × 10^6 клеток. В некоторых вариантах пороговое значение количества клеток равно, приблизительно равно или приблизительно меньше 5500 × 10^6 клеток. В некоторых вариантах пороговое значение количества клеток равно, приблизительно равно или приблизительно меньше 3500 × 10^6 клеток. В некоторых вариантах пороговое значение количества клеток равно, приблизительно равно или приблизительно меньше 3000 × 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления пороговое значение количества клеток равно или приблизительно равно, или по меньшей мере равно или приблизительно по меньшей мере равно 2500 × 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления пороговое значение количества клеток равно или приблизительно равно, или по меньшей мере равно или приблизительно по меньшей мере равно 2000 × 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления пороговое значение количества клеток равно или приблизительно равно, или по меньшей мере равно или приблизительно по меньшей мере равно 3000 × 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления пороговое значение количества клеток составляет от или приблизительно от 3000 × 10^6 клеток до или приблизительно до 2000 × 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления культивирование заканчивают, когда клетки достигают порогового значения количества клеток. В некоторых вариантах осуществления культивирование заканчивают в течение времени равном или приблизительно равном, или в пределах периода времени равном или приблизительно равном 6 часам, 12 часам, 24 часам, 36 часам, 1 дню, 2 дням, 3 дням, 4 дням, 5 дням, 6 дням или 7 дням или более, после достижения порогового значения количества клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения культивирование заканчивают в течение времени равном или приблизительно равном 1 дню после достижения порогового значения количества клеток. В некоторых вариантах осуществления культивирование заканчивается в период времени от 18 часов до 30 часов после достижения порогового значения количества клеток.

[0433] В конкретных вариантах осуществления изобретения культивирование заканчивают, когда клетки достигают пороговой плотности или концентрации клеток. В некоторых вариантах осуществления пороговая плотность клеток или концентрация клеток в выходной композиции равна или приблизительно равна, или по меньшей мере равна или приблизительно по меньшей мере равна 1 × 10^6 клеток/мл, 5 × 10^6 клеток/мл, 10 × 10^6 клеток/мл, 15 × 10^6 клеток/мл, 20 × 10^6 клеток/мл, 25 × 10^6 клеток/мл, 30 × 10^6 клеток/мл, 35 × 10^6 клеток/мл, 40 × 10^6 клеток/мл, 45 × 10^6 клеток/мл, 50 × 10^6 клеток/мл, 55 × 10^6 клеток/мл, 60 × 10^6 клеток/мл, 65 × 10^6 клеток/мл, 70 × 10^6 клеток/мл, 75 × 10^6 клеток/мл, 80 × 10^6 клеток/мл, 85 × 10^6 клеток/мл, 90 × 10^6 клеток/мл, 95 × 10^6 клеток/мл,

100×10^6 клеток/мл, или жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения средняя или медианная пороговая плотность клеток или концентрация множества клеток в выходной композиции равна или приблизительно равна, или по меньшей мере равна или приблизительно по меньшей мере равна 1×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 10×10^6 клеток/мл, 15×10^6 клеток/мл, 20×10^6 клеток/мл, 25×10^6 клеток/мл, 30×10^6 клеток/мл, 35×10^6 клеток/мл, 40×10^6 клеток/мл, 45×10^6 клеток/мл, 50×10^6 клеток/мл, 55×10^6 клеток/мл, 60×10^6 клеток/мл, 65×10^6 клеток/мл, 70×10^6 клеток/мл, 75×10^6 клеток/мл, 80×10^6 клеток/мл, 85×10^6 клеток/мл, 90×10^6 клеток/мл, 95×10^6 клеток/мл, 100×10^6 клеток/мл, или жизнеспособных клеток.

[0434] В конкретных вариантах осуществления изобретения приблизительно за один день или приблизительно за 24 часа до достижения клетками порогового значения концентрации и/или уровня размножения (например, до того, как клетки достигают порогового суммарного количества клеток, например, порогового количества клеток) общее количество клеток равно или приблизительно равно, или по меньшей мере равно или приблизительно по меньшей мере равно 50×10^6 клеток, 100×10^6 клеток, 200×10^6 клеток, 300×10^6 клеток, 400×10^6 клеток, 600×10^6 клеток, 800×10^6 клеток, 1000×10^6 клеток, 1200×10^6 клеток, 1400×10^6 клеток, 1600×10^6 клеток500×10^6 клеток, 2000×10^6 клеток, 2500×10^6 клеток, 3000×10^6 клеток, 3500×10^6 клеток, 5000×10^6 клеток, 3500×10^6 клеток, 10000×10^6 клеток, 12000×10^6 клеток, 15000×10^6 клеток или 20000×10^6 клеток или жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения приблизительно за один день или приблизительно за 24 часа до достижения клетками порогового значения количества клеток, общее количество клеток находится в диапазоне, составляющем от или приблизительно от 100×10^6 клеток до или приблизительно до 4000×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения приблизительно за один день или приблизительно за 24 часа до достижения клетками порогового значения количества клеток общее количество клеток не превышает или приблизительно не превышает 3000×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения приблизительно за один день или приблизительно за 24 часа до достижения клетками порогового значения количества клеток общее количество клеток находится в диапазоне, составляющем от или приблизительно от 500×10^6 клеток до или приблизительно до 1500×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения приблизительно за один день или приблизительно за 24 часа до достижения клетками порогового значения количества клеток общее количество клеток находится в диапазоне, составляющем от или приблизительно от 500×10^6 клеток до или приблизительно до 1000×10^6 клеток. В некоторых вариантах приблизительно за один день или приблизительно за 24 часа до достижения клетками порогового значения количества клеток общее количество клеток равно, приблизительно равно или по меньшей мере равно 900×10^6 клеток.

[0435] В конкретных вариантах осуществления изобретения, пороговое количество клеток равно или приблизительно равно, или по меньшей мере равно или приблизительно по меньшей мере равно 1000×10^6 клеток, 1200×10^6 клеток, 1400×10^6 клеток, 1600×10^6

клеток, 1800 × 10^6 клеток, 2000 × 10^6 клеток, 2500 × 10^6 клеток, 3000 × 10^6 клеток, 3500 × 10^6 клеток или жизнеспособных клеток, и при этом за один день или приблизительно за 24 часа до достижения клетками порогового значения количества клеток общее количество клеток равно, приблизительно равно или по меньшей мере равно 100 × 10^6 клеток, 200 × 10^6 клеток, 300 × 10^6 клеток, 400 × 10^6 клеток600 × 10^6 клеток, 800 × 10^6 клеток, 1000 × 10^6 клеток, 1200 × 10^6 клеток, 1400 × 10^6 клеток или 1600 × 10^6 клеток или жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения пороговое количество клеток составляет от или приблизительно от 2000 × 10^6 клеток до или приблизительно до 3000 × 10^6 клеток или жизнеспособных клеток, и при этом за один день или приблизительно за 24 часа до достижения клетками порогового значения количества клеток общее количество клеток составляет от или приблизительно от 500 × 10^6 клеток до или приблизительно до 1500 × 10^6 клеток или жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах пороговое количество клеток составляет или приблизительно 2500 × 10^6 клеток или жизнеспособных клеток, и при этом за один день или приблизительно за 24 часа до достижения клетками порогового значения количества клеток общее количество клеток равно или приблизительно равно 900 × 10^6 клеток или жизнеспособных клеток.

[0436] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование осуществляют в течение времени, необходимого для достижения порогового значения количества, плотности и/или уровня размножения клеток. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят в течение времени равного или приблизительно равного, или меньшего или приблизительно меньшего 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часов, 2 суток, 3 дней, 5 дней, 5,5 дней, 6 дней, 7 дней, 7,5 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель. В конкретных вариантах осуществления изобретения среднее время, необходимое для достижения пороговой плотности клеток отдельных композиций обогащенных Т-клеток, которые были выделены, обогащенных и/или отобранных из различных биологических образцов, равно или приблизительно равно, или менее или приблизительно менее 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 7,5 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель. В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее время, необходимое для достижения пороговой плотности клеток отдельных композиций обогащенных Т-клеток, которые были выделены, обогащенных и/или отобранных из различных биологических образцов, равно или приблизительно равно, или менее или приблизительно менее 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 7,5 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель.

[0437] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование заканчивают, когда клетки достигают порогового суммарного количества клеток, например, порогового количества клеток приблизительно равного 5500 × 10^6 клеток, и время, необходимое для достижения порогового значения количества клеток от начала

культивирования составляет от приблизительно 6 дней до приблизительно 7 дней или от 6 до 7 дней.

[0438] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование заканчивают (например, когда клетки готовы для сбора), когда клетки достигают порогового суммарного количества клеток, например, порогового количества клеток равного или приблизительно равного 5500×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения за один или приблизительно за один день или приблизительно за 24 часа или приблизительно за 24 часа до достижения клетками порогового значения количества клеток, количество клеток, например, общее количество клеток, достигает величины или приблизительно равно 3000×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения общее количество клеток равно или приблизительно равно 3000×10^6 клеток за один день до того, как клетки достигают порогового количества клеток, равного или приблизительно равного 5500×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления время, необходимое для достижения клетками порогового значения от начала культивирования, составляет от или приблизительно от 6 дней до или приблизительно до 10 дней, или от 6 дней до 10 дней, например, от или приблизительно от 7 дней до или приблизительно до 10 дней, или от 7 дней до 10 дней. В некоторых вариантах осуществления медианное значение времени, необходимое для достижения клетками порогового значения от начала культивирования равно или приблизительно равно 8 дней или составляет 8 дней.

[0439] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование заканчивается, когда клетки достигают порогового суммарного количества клеток, например, порогового количества клеток равного или приблизительно равного 2000×10^6 клеток, равного или приблизительно равного 2500×10^6 клеток, или равного или приблизительно равного 3000×10^6 клеток, и время, необходимое для достижения клетками порогового значения от начала культивирования, составляет от или приблизительно от 4 дней до или приблизительно до 5 дней, или приблизительно 5 дней или 5 дней. В некоторых вариантах осуществления пороговое количество клеток составляет от или приблизительно от 3000×10^6 клеток до или приблизительно до 2000×10^6 клеток, и время, необходимое для достижения клетками порогового значения от начала культивирования составляет от или приблизительно от 4 дней до или приблизительно до 5 дней, или приблизительно 5 дней или 5 дней.

[0440] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование заканчивается (например, когда клетки готовы для сбора), когда клетки достигают пороговой величины суммарного количества клеток, например, порогового количества клеток равного или приблизительно равного 2500×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения за один или приблизительно за один день или приблизительно за 24 часа или приблизительно за 24 часа до достижения клетками порогового значения количества клеток, количество клеток, например, общее количество клеток, достигает величины или приблизительно равно 900×10^6 клеток. В некоторых

вариантах осуществления изобретения общее количество клеток равно или приблизительно равно 900 × 10^6 клеток за день до того, как клетки достигают порогового количества клеток, равного или приблизительно равного 2500 × 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения время, необходимое для достижения порогового значения от начала культивирования, составляет от или приблизительно от 6 дней до или приблизительно до 9 дней или от 6 дней до 9 дней. В некоторых вариантах время, необходимое для достижения порогового значения от начала культивирования, составляет от или приблизительно от 5 дней до или приблизительно до 9 дней или от 5 дней до 9 дней. В некоторых вариантах время, необходимое для достижения порогового значения от начала культивирования, составляет 7 дней или или приблизительно 7 дней.

[0441] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование проводят по меньшей мере в течение минимального количества времени. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят в течение по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 4 дней, по меньшей мере 3 дней, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 36 часов, по меньшей мере 24 часов, по меньшей мере 12 часов или по меньшей мере 6 часов, если пороговое значение достигнуто до минимально необходимого количества времени. В некоторых вариантах осуществления минимальный период времени составляет, составляет приблизительно, или составляет по меньшей мере 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней. В некоторых вариантах осуществления минимальное количество времени составляет 8 дней.

[0442] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование проводят в течение минимального количества времени. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят до тех пор, пока не пройдет, приблизительно не пройдет или не пройдет по меньшей мере 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней или 13 дней после начала или инициирования инкубирования в стимулирующих условиях или со стимулирующими реагентами, например, от момента, когда клетки приводят в контакт со стимулирующим реагентом; или когда клетки и/или композиции клеток, например CD4+ и CD8+ клеток, смешивают для получения входной композиции.

[0443] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивируемые клетки являются выходными клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция обогащенных Т-клеток, которая была культивирована, представляет собой выходную композицию обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки, которые культивировали, представляют собой CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

[0444] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки собирают до того, как будет достигнуто удвоение клеток, составляющее, приблизительно составляющее или по меньшей мере составляющее однократное, двухкратное, трехкратное, четырехкратное, пятикратное, шестикратное, восьмикратное, десятикратное, двадцатикратное или более удвоений клеточной популяции, например, удвоений, которые

происходят во время культивирования или размножения клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения количество удвоений клеток может быть рассчитано путем измерения количества жизнеспособных клеток в популяции в различные моменты времени, например в различные моменты времени или на различных стадиях процесса культивирования или размножения. В конкретном варианте осуществления изобретения удвоение клеток можно вычислить сравнением общего количества жизнеспособных клеток в один момент времени с общим количеством жизнеспособных клеток в более ранней временной точке. В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование или размножение завершают до того, как будет достигнуто удвоение клеток, составляющее, приблизительно составляющее или по меньшей мере составляющее однократное, двухкратное, трехкратное, четырехкратное, пятикратное, шестикратное, восьмикратное, десятикратное, двадцатикратное или более удвоений клеточной популяции, например, удвоений, которые происходят во время культивирования или размножения клеток. В некоторых аспектах удвоение клеток вычисляется посредством определения общего числа нуклеированных клеток (TNC), когда культивирование или размножение инициируют, и когда культивирование или размножение закончено, и затем определяют натуральный логарифм полученного значения TNC, деленного на количество TNC при инициировании, и дополнительно разделенного полученного натурального log на натуральный логарифм 2.

[0445] В различных вариантах осуществления изобретения клетки отбирают или собирают до удвоения клеток входной популяции более чем в три, два или один раз. В некоторых аспектах уменьшение удвоения, которое может происходить в процессе культивирования или размножения, увеличивает часть сконструированных Т-клеток, которые являются подобными «наивным» клеткам и/или с фенотипом памяти, таким как центральный фенотип памяти. В некоторых вариантах увеличение удвоения в процессе культивирования или размножения увеличивает дифференцировку Т-клеток, которая может происходить в процессе культивирования или размножения. В некоторых аспектах предполагается, что в способе получения или приготовления сконструированных клеточных композиций уменьшение размножения или удвоений клеток, которые происходят в ходе процесса, например, во время культивирования или размножения, увеличит количество или долю Т-клеток, которые являются подобными «наивным» Т-клеткам и/или Т-клетками с фенотипом памяти, таким как центральный фенотип памяти, полученных в результате конструирования клеток. В конкретных аспектах увеличение размножения или удвоений клеток, которые происходят в ходе процесса по изобретению, увеличивает количество или долю дифференцированных Т-клеток в полученной композиции из сконструированных клеток. В некоторых аспектах предполагается, что способы, включая описанные здесь способы, которые повышают или увеличивают долю Т-клеток, которые являются подобными «наивным» Т-клеткам и/или Т-клетками с фенотипом памяти, таким как центральный фенотип памяти, в полученной композиции из сконструированных клеток могут обеспечить повышение потенциальной возможности,

эффективности и устойчивости, например, in vivo после введения сконструированной композиции клеток.

[0446] В некоторых аспектах количество удвоений клеток в популяции определяют по следующей формуле:

$$\text{1) Удвоение клеток} = \frac{\ln\left(\frac{TNC \text{ при сборе}}{TNC \text{ через 3 дня после активации}}\right)}{\ln 2}$$

В некоторых вариантах осуществления изобретения удвоение клеток в популяции композиции клеток, определенной с использованием этой формулы, равно или приблизительно равно, или больше или приблизительно больше 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее удвоение популяции клеток в клеточных композициях равно или приблизительно равно, или больше или приблизительно больше 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее удвоение популяции клеток в клеточных композиций составляет от приблизительно 3,0 до приблизительно 9,0, или от приблизительно 5 до приблизительно 7,0.

[0447] В некоторых аспектах количество удвоений клеток в популяции определяют по следующей формуле:

$$\text{2) Удвоение клеток} = \frac{\ln\left(\frac{TNC \text{ при сборе}}{TNC \text{ при аинициировании смтимуляции}}\right)}{\ln 2}$$

В некоторых вариантах осуществления изобретения удвоение клеток в популяции композиции клеток, определенной с использованием этой формулы, равно или приблизительно равно, или больше или приблизительно больше 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее удвоение популяции клеток в клеточных композициях равно или приблизительно равно, или больше или приблизительно больше 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее удвоение популяции клеток в клеточных композиций составляет от приблизительно 3,0 до приблизительно 9,0, или от приблизительно 5 до приблизительно 7,0.

[0448] В некоторых аспектах количество удвоений клеток в популяции определяют по следующей формуле:

$$\text{3) Удвоение клеток} = \frac{\ln\left(\frac{TNC \text{ при сборе}}{TNC \text{ после стимуляции}}\right)}{\ln 2}$$

В некоторых вариантах осуществления изобретения удвоение клеток в популяции композиции клеток, определенной с использованием этой формулы, равно или приблизительно равно, или больше или приблизительно больше 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее удвоение популяции клеток в клеточных композициях равно или приблизительно равно, или больше или приблизительно больше 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее удвоение популяции клеток в клеточных композиций составляет от приблизительно 3,0 до приблизительно 9,0, или от приблизительно 5 до приблизительно 7,0.

[0449] В некоторых аспектах количество удвоений клеток в популяции определяют по следующей формуле:

$$\text{4) Удвоение клеток} = \frac{\ln\left(\frac{TNC \text{ при сборе}}{TNC \text{ при трансдукции}}\right)}{\ln 2}$$

В некоторых вариантах осуществления изобретения удвоение клеток в популяции композиции клеток, определенной с использованием этой формулы, равно или приблизительно равно, или больше или приблизительно больше 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее удвоение популяции клеток в клеточных композициях равно или приблизительно равно, или больше или приблизительно больше 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее удвоение популяции клеток в клеточных композиций составляет от приблизительно 3,0 до приблизительно 9,0, или от приблизительно 5 до приблизительно 7,0.

[0450] В некоторых аспектах количество удвоений клеток в популяции определяют по следующей формуле:

$$\text{5) Удвоение клеток} = \frac{\ln\left(\frac{TNC \text{ при сборе}}{TNC \text{ в начале культивирования или размножения}}\right)}{\ln 2}$$

В некоторых вариантах осуществления изобретения удвоение клеток в популяции композиции клеток, определенной с использованием этой формулы, равно или приблизительно равно, или больше или приблизительно больше 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее удвоение популяции клеток в клеточных композициях равно или приблизительно равно, или больше или приблизительно больше 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее удвоение популяции клеток в клеточных композиций составляет от

приблизительно 3,0 до приблизительно 9,0, или от приблизительно 5 до приблизительно 7,0.

[0451] В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование или размножение завершают до того как общее количество клеток, например общее количество культивируемых клеток или клеток, подвергавшихся размножению, превысит количество клеток входной популяции, например, общее количество клеток, которые контактируют со стимулирующим реагентом, более или приблизительно более чем в один, два, три, четыре, пять, шесть, восемь, десять, двадцать раз или более чем в двадцать раз. В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование или размножение завершают до того как общее количество клеток, например общее количество культивируемых клеток или клеток, подвергавшихся размножению, станет равным или приблизительно равным, или превысит или приблизительно превысит в 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или в 10,0 раз количества клеток входной популяции, например, общего количества клеток, которые контактировали со стимулирующим реагентом. В различных вариантах осуществления изобретения культивирование или размножение завершают до того, как общее количество культивируемых клеток будет больше или приблизительно больше в один, два, три, четыре, пять, шесть, восемь, десять, двадцать раз или более чем в двадцать раз общего количества клеток, которые были трансформированы, трансдуцированы или спинокулированы, например, общего количества клеток, которые были приведены в контакт с вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления изобретения культивирование или размножение завершают до того как общее количество клеток, например общее число культивируемых клеток или клеток, подвергавшихся размножению, станет равным или приблизительно равным, или превысит или приблизительно превысит в 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или в 10,0 раз общего количества клеток, которые были трансформированы, трансдуцированы или спинокулированы, например, общего количества клеток, которые были приведены в контакт с вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество удвоений клеток в популяции композиции клеток равно или приблизительно равно, или превышает или приблизительно превышает величину 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее количество удвоений клеток в популяции клеточных композиций равно или приблизительно равно 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее количество удвоений клеток в популяции клеточных композиций находится в пределах приблизительно от 3,0 до приблизительно 9,0, или приблизительно от 5 до приблизительно 7,5. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой Т-клетки, жизнеспособные Т-клетки, CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, Т-клетки экспрессирующие CAR или любую их комбинацию.

[0452] В конкретных вариантах осуществления изобретения, когда культивирование заканчивается, клетки в выходной композиции достигают плотности клеток или концентрации клеток в выходной композиции, где среднее или медианное значение плотности клеток или концентрации клеток равно или приблизительно равно 1×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 10×10^6 клеток/мл, 15×10^6 клеток/мл, 20×10^6 клеток/мл, 25×10^6 клеток/мл, 30×10^6 клеток/мл, 35×10^6 клеток/мл, 40×10^6 клеток/мл, 45×10^6 клеток/мл, 50×10^6 клеток/мл, 55×10^6 клеток/мл, 60×10^6 клеток/мл, 65×10^6 клеток/мл, 70×10^6 клеток/мл, 75×10^6 клеток/мл, 80×10^6 клеток/мл, 85×10^6 клеток/мл, 90×10^6 клеток/мл, 95×10^6 клеток/мл, 100×10^6 клеток/мл, или жизнеспособных клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения, когда культивирование заканчивается, клетки в выходной композиции достигают плотности или концентрации клеток, где среднее или медианное значение плотности клеток или концентрации клеток находится в диапазоне равном или приблизительно равном от 15×10^6 клеток/мл до 45×10^6 клеток/мл, от 20×10^6 клеток/мл до 40×10^6 клеток/мл, и составляет, например, приблизительно 21×10^6 клеток/мл, 22×10^6 клеток/мл, 23×10^6 клеток/мл, 24×10^6 клеток/мл, 25×10^6 клеток/мл, 26×10^6 клеток/мл, 27×10^6 клеток/мл, 28×10^6 клеток/мл, 29×10^6 клеток/мл, 30×10^6 клеток/мл, 31×10^6 клеток/мл, 32×10^6 клеток/мл, 33×10^6 клеток/мл, 34×10^6 клеток/мл, 35×10^6 клеток/мл, 36×10^6 клеток/мл, 37×10^6 клеток/мл, 38×10^6 клеток/мл или 39×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления средняя или медианная плотность или концентрация клеток находится в диапазоне от приблизительно 30×10^6 клеток/мл до приблизительно 40×10^6 клеток/мл, от приблизительно 15×10^6 клеток/мл до приблизительно 25×10^6 клеток/мл, от приблизительно 35×10^6 клеток/мл до приблизительно 40×10^6 клеток/мл или от приблизительно 20×10^6 клеток/мл до приблизительно 25×10^6 клеток/мл.

Контроль клеток в процессе культивирования

[0453] В некоторых вариантах осуществления изобретения во время стадии культивирования клетки контролируют. Контроль может быть осуществлен, например, для определения (например, для измерения, количественного определения) морфологии клеток, жизнеспособности клеток, уровня гибели клеток и/или концентрации клеток (например, концентрации или количества жизнеспособных клеток). В некоторых вариантах осуществления изобретения контроль выполняют вручную, например, человеком-оператором. В некоторых вариантах осуществления изобретения контроль выполняют с использованием автоматизированной системы. Автоматизированная система может требовать минимального участия человека или не требовать участия человека для контроля культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения контроль выполняют как вручную, так и с использованием автоматизированной системы.

[0454] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки контролируются автоматизированной системой, не требующей участия человека. В некоторых вариантах осуществления автоматизированная система совместима с биореактором, например биореактором, описанным здесь, так что культивируемые клетки могут быть удалены из

биореактора под контролем системы, а затем возвращены в биореактор. В некоторых вариантах осуществления изобретения контроль и культивирование происходят в системе с замкнутым контуром. В некоторых аспектах система с замкнутым контуром, включающая автоматизированную систему и биореактор, являются стерильными. В некоторых вариантах автоматизированная система является стерильной. В некоторых вариантах автоматизированная система представляет собой встроенную систему.

[0455] В некоторых вариантах осуществления изобретения автоматизированная система предусматривает использование оптических методов (например, микроскопии) для контроля морфологии клеток, жизнеспособности клеток, уровня гибели клеток и/или определения концентрации клеток (например, концентрации жизнеспособных клеток, количества жизнеспособных клеток). Любая оптическая методика, подходящая для оценки клеток, например, для определения характеристик клеток, жизнеспособности, концентрации и количества рассматриваются как приемлемые. Неограничивающие примеры подходящих оптических методов включают микроскопию светлого поля, флуоресцентную микроскопию, дифференциальную интерференционную контрастную микроскопию, фазовую контрастную микроскопию, цифровую голографическую микроскопию (DHM), дифференциальную цифровую голографическую микроскопию (DDHM) или их комбинацию. Дифференциальная цифровая голографическая микроскопия, DDHM и дифференциальная DHM могут использоваться здесь взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления автоматизированная система включает дифференциальный цифровой голографический микроскоп. В некоторых вариантах автоматизированная система включает дифференциальный цифровой голографический микроскоп, включающий средство освещения (например, лазер, светодиод). Описание метода DDHM и его применения можно найти, например, в патентах US 7362449; EP 1631788; US 9904248 и US 69684281, которые включены в данное описание во всей их полноте посредством ссылки.

[0456] DDHM позволяет осуществлять неразрушающую визуализацию клеток и не требующую использования меток, что приводит к получению высококонтрастных голографических изображений. Изображения могут подвергаться сегментации объектов, что позволяет проводить дальнейший анализ для получения множества морфологических признаков, которые количественно описывают отображаемые объекты (например, культивируемые клетки, обломки клеток). Различные признаки (например, морфология клеток, жизнеспособность клеток, концентрация клеток, количество клеток) могут быть непосредственно оценены или вычислены на основании DDHM с использованием, например, стадий получения изображения, обработки изображений, сегментации изображения и выделения признаков. В некоторых вариантах осуществления изобретения автоматизированная система включает устройство цифровой записи для записи голографических изображений. В некоторых вариантах осуществления автоматизированная система включает компьютер с алгоритмами для анализа голографических изображений. В некоторых вариантах осуществления изобретения

автоматизированная система включает монитор и/или компьютер для отображения результатов анализа голографического изображения. В некоторых вариантах осуществления изобретения анализ автоматизирован (т.е. он выполняется без участия пользователя). Пример подходящей автоматизированной системы для мониторинга клеток во время культивирования включает, без ограничения , Ovizio iLine F (Ovizio Imaging Systems NV/SA, Brussels, Belgium).

[0457] В некоторых вариантах осуществления изобретения контроль во время стадии культивирования выполняют непрерывно. В некоторых вариантах осуществления изобретения контроль во время стадии культивирования выполняют в режиме реального времени. В некоторых вариантах осуществления изобретения контроль во время стадии культивирования выполняют в дискретные моменты времени. В некоторых вариантах осуществления изобретения контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере каждые 15 минут. В некоторых вариантах контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере каждые 30 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере каждые 45 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере каждый час. В некоторых вариантах контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере каждые 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере каждые 4 часа. В некоторых вариантах осуществления контроль на стадии культивирования осуществляют проводят по меньшей мере каждые 6 часов. В некоторых вариантах контроль в течение продолжительности стадии культивирования по меньшей мере каждые 8 часов. В некоторых вариантах контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере каждые 10 часов. В некоторых вариантах контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере каждые 12 часов. В некоторых вариантах контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере каждые 14 часов. В некоторых вариантах контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере каждые 16 часов. В некоторых вариантах осуществления контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере каждые 18 часов. В некоторых вариантах контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере каждые 20 часов. В некоторых вариантах осуществления контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере каждые 22 часа. В некоторых вариантах контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере один раз в день. В некоторых вариантах контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере один раз в два дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения на продолжительность стадии культивирования контроль на стадии культивирования осуществляют по меньшей мере один раз в три дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения контроль осуществляют по меньшей мере один раз в четыре дня. В некоторых вариантах контроль осуществляют по меньшей мере один раз в пять дней. В некоторых осуществления контроль осуществляют по

меньшей мере один раз в шесть дней. В некоторых вариантах контроль осуществляют по меньшей мере один раз в семь дней. В некоторых вариантах контроль осуществляют по меньшей мере один раз в восемь дней. В некоторых вариантах контроль осуществляют по меньшей мере один раз в девять дней. В некоторых вариантах контроль осуществляют по меньшей мере один раз в десять дней в течение выполнения стадии культивирования. В некоторых вариантах контроль осуществляют по меньшей мере один раз за все время выполнения стадии культивирования.

[0458] В некоторых вариантах осуществления изобретения признаки клеток, которые определяют при контроле, включают признаки, которые регистрируют или определяют с использованием оптических методов, таких как DHM или DDHM, и эти признаки клеток включают жизнеспособность клеток, концентрацию клеток, количество клеток и/или плотность клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения оценивают или определяют жизнеспособность клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения оценивают или определяют концентрацию, плотность и/или количество клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения оценивают или определяют концентрацию жизнеспособных клеток, число жизнеспособных клеток и/или плотность жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения культивируемые клетки контролируются автоматизированной системой до тех пор, пока не будет достигнут порог размножения, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения при достижении клетками порога размножения, культивируемые клетки собирают, например, автоматическим или ручным способом, например, оператором. Порог размножения может зависеть от общей концентрации, плотности и/или количества культивируемых клеток, котрые контролируются автоматизированной системой. Альтернативно, порог размножения может зависеть от концентрации жизнеспособных клеток, плотности и/или количества этих клеток. Оценка количества клеток и подсчет клеток могут использоваться здесь взаимозаменяемо.

[0459] В некоторых вариантах осуществления изобретения из собранных клетоки готовят конечную композицию, как описано здесь, например, в присутствии фармацевтически приемлемого носителя. В некоторых вариантах осуществления изобретения из собранных клетоки готовят конечную композицию в присутствии криопротектора.

E. Приготовление композиции клеток

[0460] В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько стадий процесса (например, проводимых в центрифужной камере и/или закрытой системе) для получения, изготовления или производства клеток и/или сконструированных клеток для клеточной терапии могут включать приготовление композиции клеток, такой как композиция генетически сконструированных клеток, полученных на стадии трансдукци до или после культивирования, например культивирования и размножения, и/или одной или нескольких других стадий обработки, как описано здесь. В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагаемые способы, связанные с получением композиции

клеток, включают обработку трансдуцированных клеток, таких как клетки, трансдуцированные и/или размноженные с использованием описанных выше стадий обработки, в закрытой системе.

[0461] В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток до изготовления композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток после культивирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток после культивирования и до приготовления композиции культивируемых клеток, например, в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулирующим реагентом является стимулирующий реагент, который описан здесь, например, в Разделе I-B-1. В конкретных вариантах осуществления изобретения стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток, как описано здесь, например, в Разделе I-B-2.

[0462] В некоторых вариантах осуществления изобретения конечную композицию клеток изготавливают через период времени, составляющий от 0 до 10 дней, от 0 до 5 дней, от 2 до 7 дней, от 0,5 до 4 дней или от 1 до 3 дней, после того, как клетки достигли порогового значения количества клеток, плотности и/или уровня размножения во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетки готовят в виде конечной композиции клеток через или приблизительно через 12 часов, 18 часов, 24 часов, 1 день, 2 дня или 3 дня после достижения порогового значения количества клеток, плотности и/или уровня размножения во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки готовят в виде конечной композиции клеток через или приблизительно через 1 день после достижения порогового значения количества клеток, плотности и/или уровня размножения во время культивирования.

[0463] В некоторых вариантах изобретения предложены способы получения, изготовления или производства клеток и/или сконструированных клеток для клеточной терапии могут включать приготовление композиции клеток, такой как композиция генетически сконструированных клеток, полученных на стадии трансдукци до или после культивирования, например культивирования и размножения, и/или одной или нескольких других стадий обработки, как описано здесь. В некоторых вариантах предлагаемые способы, связанные с получением композиции клеток, включают обработку трансдуцированных клеток, таких как клетки, трансдуцированные и/или размноженные с использованием описанных выше стадий обработки, в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза клеток, содержащих клетки, сконструированные с рекомбинантным антигенным рецептором, например CAR или TCR, представлена в виде композиции или препарата, например, в виде фармацевтической композиция или фармацевтического препарата. Такие композиции могут быть использованы в соответствии с предлагаемыми способами, такими как предотвращение

или лечение заболеваний, состояний и расстройств, или в способах выявления, диагностики, а также в прогностических методах.

[0464] В некоторых случаях клетки обрабатывают в рамках одной или нескольких стадий (например, проводимых в центрифужной камере и/или закрытой системе) для получения, изготовления или производства клеток и/или сконструированных клеток для клеточной терапии могут включать приготовление композиции клеток, такой как композиция генетически сконструированных клеток, полученных на стадии трансдукции до или после культивирования, например культивирования и размножения, и/или одной или нескольких других стадий обработки, как описано здесь. В некоторых случаях клетки могут быть представлены в композиции или препарате в количестве, эффективном для введения дозы, например, для однократной стандартной дозы или в дозе для многократного введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагаемые способы, связанные с получением конечного препарата иди композиции клеток, включают обработку трансдуцированных клеток, таких как клетки, трансдуцированные и/или размноженные с использованием описанных выше стадий обработки, в закрытой системе.

[0465] В некоторых вариантах осуществления изобретения готовят одну или несколько композиций обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения одну или несколько конечных композиций обогащенных Т-клеток получают после того, как были получены и/или культивированы одна или несколько композиций клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения одна или несколько композиций являются входными композициями. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько входных композиций были предварительно заморожены, и их хранили, а затем оттаивали перед инкубацией.

[0466] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки в композиции представляют собой выходные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция обогащенных Т-клеток представляет собой выходную композицию обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки в композиции представляют собой выходные CD4+ и CD8+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления изобретения полученная композиция клеток, например, композиция обогащенных CD4+ и CD8+ клеток, представляет собой выходную композицию клеток, например, выходную композицию обогащенных CD4+ и CD8+ клеток.

[0467] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки могут быть включены в контейнер, такого как пакет/мешок или флакон. В некоторых вариантах осуществления изобретения из клеток готовят конечную композицию в период времени, составляющий от 0 до 10 дней, от 0 до 5 дней, от 2 до 7 дней, от 0,5 до 4 дней или от 1 до 3 дней после того, как клетки достигли порогового значения количества клеток, плотности и/или уровня размножения во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения из клеток готовят композицию в период времени,

составляющий 12 часов, 18 часов, 24 часов, 1 день, 2 дня или 3 дня после того, как клетки достигли порогового значения количества клеток, плотности и/или уровня размножения во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения из клеток готовят композицию в пределах одного дня с момента, как клетки достигли порогового значения количества клеток, плотности и/или уровня размножения во время культивирования.

[0468] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки культивируют в течение минимального периода времени, и клетки собирают в менее активированном состоянии, чем если бы они были приготовлены в более ранний момент времени во время культивирования, независимо от того, когда достигнуто пороговое значение. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки культивируют в течение времени от 0 дня до 3 дней, например от 0 до 20 дней, от 0 до 3 дней, от 1 до 2 дней, или в течение времени равного или приблизительно равного 1 дню, 2 дням или 3 дням, после того, как во время культивирования было достигнуто пороговое значение количества клеток, плотности и/или уровня размножения. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки достигают порогового значения количества клеток, плотности и/или уровня размножения, и их оставляют культивироваться в течение минимального времени или периода времени до получения композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, которые достигли порогового значения, не используют для приготовления композиции до тех пор, пока они не будут культивированы в течение минимального времени или периода времени, составляющего от 1 дня до 14 дней, от 2 дней до 7 дней, или от 3 дней до 6 дней, или в течение минимального времени или периода времени, составляющего или приблизительно составляющего 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или более чем 7 дней. В некоторых вариантах осуществления минимальное время или продолжительность этого культивирования составляет от 3 до 6 дней.

[0469] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки готовят в виде композиции в фармацевтически приемлемом буфере, который в некоторых аспектах может включать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В некоторых вариантах осуществления изобретения обработка клеток при приготовлении композиции включает обмен среды или буфера для композиции, который является фармацевтически приемлемым или допустимым для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения стадии приготовления композиции могут включать промывку трансдуцированных и/или размноженных клеток в фармацевтически приемлемом буфере, который может включать один или несколько необязательных фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. Примеры таких фармацевтических компонентов, включая фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты, описаны ниже в сочетании с компонентами, приемлемыми для введения клеток и композиций субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит клетки в количестве, эффективном для лечения

или предупреждения заболевания или состояния, составляющее терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество.

[0470] Фармацевтически приемлемый носитель представляет собой ингредиент в фармацевтической композиции, отличный от активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, без ограничения буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

[0471] В некоторых аспектах изобретения выбор носителя частично определяется конкретной клеткой и/или способом введения. Таким образом, существует множество подходящих соединений для приготовления композиций или препаратов. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и бензалконийхлорид. В некоторых аспектах используют смесь двух или более консервантов. Консервант или их смеси обычно присутствуют в количестве от приблизительно 0,0001% до приблизительно 2% от общей массы композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители в используемых дозах и концентрациях обычно являются нетоксичными для реципиентов и включают, без ограничения: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензэтония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (приблизительно менее из 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; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как ионы натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

[0472] В некоторых аспектах изобретения в состав композиции включены буферные агенты. Подходящие буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах используется смесь двух или более буферных агентов. Буферный агент или их смеси обычно присутствуют в количестве от приблизительно 0,001% до приблизительно 4% от общего веса композиции. Способы приготовления вводимых фармацевтических композиций известны. Приводимые в качестве примера способы описаны более подробно, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21-е изд. (1 мая 2005 г.)

[0473] Препараты могут включать водные растворы. Препарат или композиция также может содержать более одного активного ингредиента, применимого для профилактики или лечения конкретного показания, заболевания или состояния с помощью клеток, включая один или более активных ингредиентов, активности которых дополняют клетки, и/или соответствующие активности которых не оказывают вредного влияния друг на друга. Такие активные ингредиенты соответственно присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемой цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает, кроме того, другие фармацевтически активные агенты или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические средства, например аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и/или винкристин.

[0474] В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции 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 значения pH. Жидкие композиции могут содержать носители, которые могут быть растворителем или диспергирующей средой, содержащей, например, воду, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения клеток в растворитель, такой как растворитель в смеси с подходящим носителем, разбавителем или эксципиентом, где растворителем является стерильная вода, физиологический солевой раствор, раствор глюкозы, декстрозы или тому подобное. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие, диспергирующие или эмульгирующие агенты (например, метилцеллюлозу), буферирующие pH агенты, гелеобразующие или улучшающие вязкость добавки, консерванты, ароматизаторы и/или красители, в зависимости от пути введения и желаемого препарата. Стандартные методики могут в некоторых аспектах помочь в получении подходящих препаратов.

[0475] В композиции могут быть введены различные добавки, которые повышают стабильность и стерильность композиций, включая антимикробные консерванты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и буферы. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом и сорбиновой кислотой. Пролонгированное всасывание инъекционной фармацевтической формы может быть достигнуто за счет использования агентов, задерживающих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0476] В некоторых вариантах осуществления изобретения буфер композиции содержит криостабилизатор. В некоторых вариантах осуществления изобретения из клеток готовят композиции или препараты с раствором криоконсерванта, который

содержит 1,0-30%-ный раствор DMSO, такой как 5-20%-ный раствор DMSO или 5-10%-ный раствор DMSO. В некоторых вариантах осуществления раствор для криоконсервирования представляет собой или содержит, например, PBS, содержащий 20% DMSO и 8% сывороточного альбумина человека (HSA), 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% DMSO. В некоторых вариантах осуществления стадии обработки могут включать промывку трансдуцированных и/или размноженных клеток для замены клеток в растворе криоконсерванта. В некоторых вариантах осуществления клетки замораживают, например, криогенно или путем криоконсервирования, в среде и/или растворе с конечной концентрацией DMSO равной или приблизительно равной 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9,0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5%, или 5,0% DMSO, или от 1% до 15%, от 6% до 12%, от 5% до 10% или от 6% до 8% DMSO. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки замораживают, например, криогенно или путем криоконсервирования, в среде и/или растворе с конечной концентрацией HSA равной или приблизительно равной 5,0%, 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,25%, 1,0%, 0,75%, 0,5% или 0,25% HSA, или от 0,1% до 5%, от 0,25% до 4%, от 0,5% до 2% или от 1% до 2% HSA.

[0477] В конкретных вариантах осуществления изобретения композиция обогащенных Т-клеток, например Т-клеток, которые были стимулированы, сконструированы и/или культивированы, готовят, криогенно замораживают и затем хранят в течение некоторого времени. В некоторых вариантах осуществления изобретения приготовленные криогенные композиции клеток хранят до тех пор, пока клетки не потребуются для инфузии. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения криогенно замороженные клетки хранят в течение от 1 дня до 6 месяцев, от 1 месяца до 3 месяцев, от 1 дня до 14 дней, от 1 дня до 7 дней, от 3 до 6 дней, от 6 месяцев до 12 месяцев или более 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки являются криогенно замороженными и их хранят, например, в течение или приблизительно в течение или в течение не менее 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней. В некоторых вариантах осуществления клетки оттаивают и вводят субъекту после хранения. В некоторых вариантах осуществления клетки хранят в течение или приблизительно в течение 5 дней.

[0478] В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию готовят с использованием одной или нескольких стадий обработки, включая промывку, разбавление или концентрирование клеток, такое как культивирование или размноженные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения обработка может включать разбавление или концентрирование клеток до желаемой концентрации или количества, при этом композиции могут быть представлены в виде единичных дозированных форм, которые включают количество клеток, необходимое для введения в данной дозе или его части. В некоторых вариантах осуществления изобретения стадии обработки могут включать

уменьшение объема, доводя, таким образом, концентрацию клеток до желаемой. В некоторых вариантах осуществления стадии обработки могут включать увеличение объема, доводя, таким образом, концентрацию клеток до желаемой. В некоторых вариантах обработка включает добавление объема буфера композиции к трансдуцированным и/или размноженным клеткам. В некоторых вариантах осуществления изобретения объем буфера композиции составляет от или приблизительно от 10 мл до 1000 мл, например, по меньшей мере, по меньшей мере приблизительно или приблизительно 50 мл, 100 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл или 1000 мл.

[0479] В некоторых вариантах осуществления изобретения стадии обработки при приготовлении композиции клеток проводят в закрытой системе. Такие стадии обработки могут быть выполнены, например, с использованием центрифужной камеры в сочетании с одной или несколькими системами или наборами, связанными с системой обработки клеток, такой как центробежная камера, производимая и поставляемая компанией Biosafe SA, включая системы для обработки клеток Sepax® или Sepax® 2. Типовая система и способ описаны в международной публикации WO 2016/073602. В некоторых вариантах осуществления способа предусматривается выведение из внутренней полости центрифужной камеры полученной композиции, которая включает представляет собой полученный конечный препарат клеток в подходящем буфере, таком как фармацевтически приемлемый буфер, в любом из вышеописанных вариантов осуществления. В некоторых вариантах выведение полученной композиции осуществляют в контейнер, такой как пакет/мешок, который функционально связан с центрифужной камерой как часть закрытой системы. В некоторых вариантах осуществления контейнер, такой как мешок, соединен с системой через выходную линию или выходное устройство.

[0480] В некоторых вариантах осуществления изобретения закрытая система, такая как система, связанная с центрифужной камерой или системой обработки клеток, включает многоканальное выходное устройство, содержащий многоходовой трубный коллектор, связанный на каждом конце линии трубопровода с отверстием, к которому может быть присоединено один или несколько контейнеров для приема полученной композиции. В некоторых аспектах желаемое количество или набор выходных контейнеров, например, пакетов/мешков, могут быть стерильно соединены с одним или несколькими, как правило, двумя или более, например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более портов многоканального выхода. Например, в некоторых вариантах осуществления один или несколько контейнеров, например мешков, могут быть прикреплены ко всем портам или к части портов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления система может осуществлять прием выходной композиции в несколько выходных пакетов.

[0481] В некоторых аспектах выполнения клетки могут быть собраны в одном или нескольких выходных пакетов в количестве, достаточном для введения дозы, например, для однократной стандартной дозы или для многократного введения. Например, в

некоторых вариантах осуществления, каждый из выходных пакетов может содержать количество клеток, достаточное для введения в данной дозе или его части. Таким образом, в некоторых аспектах изобретения каждый пакет может содержать одну единичную дозу для введения или может содержать часть желаемой дозы, и в этом случае более чем один из всех выходных пакетов, например два из выходных пакетов или 3 из всех выходных пакетов, вместе содержат одну дозу для введения.

[0482] Таким образом, выходные контейнеры, например мешки, обычно содержат клетки, предназначенные для введения, в количестве, достаточном, например, для одной или нескольких единичных доз. Единичная доза может представлять собой количество или число клеток, подлежащих введению субъекту, или удвоенное (или более) количество клеток, подлежащих введению. Это количество может соответствовать самой низкой дозе или самой низкой возможной дозе клеток, которые будут вводиться субъекту.

[0483] В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый из контейнеров, например пакетов/мешков, содержит единичную дозу клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления каждый из контейнеров содержит одно и то же или приблизительно одинаковое количество клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая единичная доза содержит по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1×10^6, 2×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7 или 1×10^8 сконструированных клеток, всех клеток, Т-клеток или PBMC. В некоторых вариантах осуществления объем композиции в каждом пакете составляет от 10 мл до 100 мл, например по меньшей мере или по приблизительно меньшей мере 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл или 100 мл.

[0484] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, полученные способом по изобретению, или композиция, содержащая такие клетки, вводят субъекту для лечения заболевания или состояния.

F. Иллюстративные характеристики способа

[0485] В конкретных вариантах осуществления изобретения предложенные способы используют в качестве процесса, в рамках которого получают или производят выходную композицию обогащенных Т-клеток из одной или нескольких входных композиций и/или из одного биологического образца. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, например TCR или CAR. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки выходных композиций пригодны для введения субъекту в качестве средства терапии, например, аутологичной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция представляет собой композицию обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток.

[0486] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы используются в рамках полного процесса получения или приготовления выходных клеток и/или выходных композиций обогащенных Т-клеток, где способ включает некоторые или все следующие стадии: сбор или получения биологического образца; выделение, отбор

или обогащение входных клеток из биологического образца; криогенная заморозка и хранение входных клеток; размораживание и/или инкубирование входных клеток в условиях стимуляции; конструирование стимулированных клеток для включения и экспрессии рекомбинантного полинуклеотида, например полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, такой как CAR; культивирование сконструированных клеток до порогового значения, количества плотности или уровня размножения; приготовление культивированных клеток в виде выходной композиции; и/или криогенное замораживание и хранение выходных клеток в составе выходной композиции до тех пор, пока клетки не будут использованы для инфузии и/или не потребуются для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения весь процесс осуществляют с использованием одной композиции обогащенных Т-клеток, например CD4+ и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах процесс осуществляют с использованием двух или более входных композиций обогащенных Т-клеток, которые объединяют до и/или во время процесса для получения или приготовления единой выходной композиции обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления обогащенные Т-клетки представляют собой или включают сконструированные Т-клетки, например Т-клетки, трансдуцированные для экспрессии рекомбинантного рецептора.

[0487] В некоторых вариантах процесс, связанный с предложенными способами, сравнивается с альтернативным процессом. В конкретных вариантах осуществления альтернативный способ может отличаться одним или более конкретными аспектами, но в остальном содержит аналогичные или те же признаки, аспекты, стадии, операции, реагенты и/или условия проведения процесса, связанного с представленными способами. В некоторых вариантах осуществления альтернативный способ аналогичен процессу, связанному с предлагаемыми способами, но отличается тем, что включает, без ограничения, один или несколько различных реагентов и/или препаратов для среды; наличие сыворотки во время инкубирования, трансдукции, трансфекции и/или культивирования; другой клеточный состав входной композиции, например, соотношение CD4+ и CD8+ Т-клеток; различное количество и/или концентрации входных клеток, инкубируемых в условиях стимуляции; различные условия стимуляции и/или использование другого стимулирующего реагента; различное соотношение стимулирующего реагента и клеток; различный вектор и/или способ трансдукции; различное время или порядок инкубирования, трансдукции и/или трансфекции клеток; отсутствие или различие в одном или нескольких рекомбинантных цитокинов, присутствующих во время инкубирования, трансдукции, трансфекции и/или культивирования; различное количество и/или концентрацию трансдуцируемых клеток; различные условия качания и/или перфузии во время культивирования; и/или другое пороговое значение количества, плотности или уровня размножения, достигаемое за время культивирования.

[0488] В некоторых вариантах осуществления изобретения, процесс завершают в течение времени, которое составляет или приблизительно составляет 35 дней, 34 дня, 33

дня, 32 дня, 31 день, 30 дней, 29 дней, 28 дней, 27 дней, 26 дней, 25 дней, 24 дня, 23 дня, 22 дня, 21 день, 20 дней, 19 дней, 18 дней, 17 дней, 16 дней, 15 дней, 14 дней, 13 дней, 12 дней, 11 дней, 10 дней, 9 дней или менее 9 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс завершают за 25 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс завершают за 21 день. В конкретных вариантах осуществления процесс завершают в течение периода времени от 14 дней до 18 дней. В некоторых вариантах осуществления процесс считают завершенным, когда: композицию собирают и/или готовят; композиция готова для сбора и/или приготовления препарата; композиция достигает заданной пороговой величины показателя для сбора; композиция выделяют и/или она готова для тестирования после приготовления препарата; композиция готова для введения субъекту, и/или композицию вводят субъекту; включая время хранения для криозамороженных композиций. В конкретных вариантах осуществления изобретения, когда процесс проводят нв отношении более чем одной композиции обогащенных Т-клеток, полученных из одного биологического образца, процесс считается завершенным, когда по меньшей мере один репрезентативный образец каждой композиции из одного и того же биологического образца прошел все стадии процесса.

[0489] В некоторых вариантах осуществления изобретения процесс завершают в течение 21 дня, из расчета от начала или сбора биологического образца и/или выделения, отбора, стимуляции и/или обогащения входных клеток из биологического образца до момента, когда выходные клетки представляются для инфузии. В конкретных вариантах осуществления изобретения процесс завершают в течение времени от 14 дней до 18 дней, из расчета от начала или сбора биологического образца и/или выделения, отбора, стимуляции и/или обогащения входных клеток из биологического образца до момента, когда выходные клетки представляются для инфузии и/или они готовы для введения субъекту.

[0490] В некоторых вариантах осуществления изобретения продолжительность времени процесса от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции, до момента, когда собирают выходные клетки, готовят препарат и/или криозамораживают, составляет 5 дней или приблизительно 5 дней, от 5 до 25 дней, от 7 до 18 дней, от 8 до 15 дней, от 14 до 18 дней, от 8 до 14 дней, от 8 до 15 дней, например от 8 до 13 дней, или от 9 до 13 дней. В конкретных вариантах осуществления изобретения продолжительность времени процесса от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции, до момента, когда собирают выходные клетки, готовят препарат и/или криозамораживают, находится в пределах от 7 до 10 дней, от 6 до 9 дней или от 5 до 8 дней.

[0491] В некоторых вариантах осуществления изобретения среднее время и/или продолжительность процесса от начала или инициирования инкубирования до достижения пороговых величин приблизительно равно или приблизительно менее 5 дней, от 5 до 25 дней, от 7 до 18 дней, от 9 до 13 дней, от 14 до 18 дней, или равно или менее или приблизительно менее 5 дней, 5,5 дней, 6 дней, 6,5 дней, 7 дней, 7,5 дней, 8 дней, 9

дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней или 13 дней. В конкретных вариантах осуществления изобретения среднее время и/или продолжительность процесса от начала или инициирования инкубирования до момента достижения пороговых показателей, приблизительно равно или приблизительно менее 5 дней, от 5 до 25 дней, от 7 до 18 дней, от 14 до 18 дней, от 8 до 13 дней или от 9 до 13 дней, или равно, или менее, или приблизительно равно 5 дням, 5,5 дням, 6 дням, 6,5 дням, 7 м, 7,5 дням, 8 дням, 9 дням, 10 дням, 11 дням, 12 дням или 13 дням. В конкретных вариантах осуществления изобретения продолжительность и/или время процесса от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции, до момента достижения пороговых показателей, составляет 5 дней или приблизительно 5 дней, от 5 до 7 дней, от 7 до 10 дней, от 6 до 9 дней или от 5 до 8 дней.

[0492] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения степень успеха, при которой сконструированные клетки (например, CAR Т-клетки) могут быть успешно получены данным способом, составляет по меньшей мере или приблизительно составляет 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых аспектах степень успеха определяют как процент субъектов, от которых были получены образцы, например, с помощью афереза, например, с помощью предлагаемого способа, где такие клетки отвечают критериям процесса, включая сбор, приготовление композиции и/или криоконсервирования выходных клеток, в момент времени, который составляет приблизительно или менее чем приблизительно 5 дней, от 5 до 10 дней, например от 7 до 10 дней, от 6 до 9 дней или от 5 до 8 дней, например 5 дней, 5,5 дней, 6 дней, 6,5 дней, 7 дней или 7,5 дней после инициирования стимуляции клеток стимулирующим реагентом. В некоторых аспектах степень успеха определяют как процент субъектов, от которых были получены образцы, например, с помощью афереза, например, с помощью предлагаемого способа, где такие клетки отвечают критериям процесса, при повторной инфузии сконструированных клеток субъекту, включая тестирование препарата клеток, выделение клеток для инфузии и/или готовы для введения субъекту, в момент времени, соответствующему 21 дню после инициирования стимуляции клеток стимулирующим реагентом.

[0493] В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда продолжительность и/или время процесса от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции до момента, когда собирают выходные клетки, готовят препарат и/или криозамораживают, находится в пределах от 9 до 15 дней, то доля указанных субъектов составляет приблизительно, или по меньшей мере, или приблизительно по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% от количества субъектов, от которых получали клетки для выполнения заявленного способа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда продолжительность и/или время процесса от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции до момента, когда собирают выходные клетки, готовят препарат и/или криозамораживают, находится в пределах от 14 дней до 18 дней, то доля указанных субъектов составляет приблизительно, или по

меньшей мере, или приблизительно по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% от количества субъектов, от которых получали клетки для выполения заявленного способа. В конкретных вариантах осуществления изобретения, когда продолжительность и/или время процесса от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции до момента, когда собирают выходные клетки, готовят препарат и/или криозамораживают, находится в пределах от 7 дней до 10 дней, то доля указанных субъектов составляет приблизительно, или по меньшей мере, или приблизительно по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% от количества субъектов, от которых получали клетки для выполнения заявленного способа. В конкретных вариантах осуществления изобретения, когда продолжительность и/или время процесса от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции до момента, когда собирают выходные клетки, готовят препарат и/или криозамораживают, находится в пределах от 6 дней до 9 дней, то доля указанных субъектов составляет приблизительно, или по меньшей мере, или приблизительно по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% от количества субъектов, от которых получали клетки для выполнения заявленного способа. В конкретных вариантах осуществления изобретения, когда продолжительность и/или время процесса от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции до момента, когда собирают выходные клетки, готовят препарат и/или криозамораживают, находится в пределах от 5 дней до 8 дней, то доля указанных субъектов составляет приблизительно, или по меньшей мере, или приблизительно по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% от количества субъектов, от которых получали клетки для выполнения заявленного способа. В некоторых вариантах такие субъекты являются пациентами, которые имеют заболевание или состояние, такое как рак, например, множественную миелому.

[0494] В некоторых вариантах осуществления изобретения продолжительность и/или время процесса от выделении, обогащения и/или отбора композиций обогащенных CD4+ и CD8+ клеток из биологического образца, например, аферезом и/или лейкаферезом, до сбора выходных клеток, приготовления препарата и/или криозамораживания, составляет от 5 до 25 дней, от 7 до 18 дней, от 14 до 18 дней, от 8 до 19 дней, от 8 до 14 дней, или от 10 до 16 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда выходные клетки собирают, готовят препарат и/или выделяют в момент времени от 10 до 16 дней после выделения, обогащения и/или отбора, доля таких субъектов составляет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% от количества субъектов, в отношении которых был выполнен способ получения клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда выходные клетки собирают, готовят препарат и/или выделяют в момент времени от 14 до 18 дней после выделения, обогащения и/или отбора, доля таких субъектов составляет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по

меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% от количества субъектов, в отношении которых был выполнен способ получения клеток.

[0495] В некоторых вариантах осуществления изобретения, процесс завершают в течение времени, составляющего или приблизительно составляющего 35 дней, 34 дня, 33 дня, 32 дня, 31 дня, 30 дней, 29 дней, 28 дней, 27 дней, 26 дней, 25 дней, 24 дня, 23 дня, 22 дня, 21 день, 20 дней, 19 дней, 18 дней, 17 дней, 16 дней, 15 дней, 14 дней, 13 дней, 12 дней, 11 дней, 10 дней, 9 дней или менее 9 дней, от начала процесса или получения биологического образца, например, аферезом или лейкоаферезом, до момента времени, когда выходную композицию вводят или она готова для введения субъекту, выходные клетки собирают и/или из них готовят препарат; выходные клетки готовы для сбора и/или приготовления препарата; выходные клетки достигли заданного порогового значения показателей для их сбора; и/или выходная композиция готова для тестирования, включая время хранения для криозамороженных композиций. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот процесс завершают в течение 21 дня от начала процесса или получения биологического образца до момента времени, когда выходные клетки готовы для введения и/или готовы для инфузии, например, субъекту.

[0496] В некоторых вариантах осуществления изобретения, процесс завершают в течение времени или периода времени, которое составляет или приблизительно составляет 35 дней, 34 дня, 33 дня, 32 дня, 31 день, 30 дней, 29 дней, 28 дней, 27 дней, 26 дней, 25 дней, 24 дня, 23 дня, 22 дня, 21 день, 20 дней, 19 дней, 18 дней, 17 дней, 16 дней, 15 дней, 14 дней, 13 дней, 12 дней, 11 дней, 10 дней, 9 дней или менее 9 дней, при доверительном интервале значений равному или приблизительно равному или по меньшей мере равному 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,9%, для периода времени от начала процесса или получения биологического образца и/или выделения, отбора, стимуляции и/или обогащения входных клеток из биологического образца до момента времени, когда выходные клетки выделяют для инфузии, включая время хранения криозамороженной композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения процесс завершают в течение от 14 дней до 18 дней, при доверительном интервале значений равному или приблизительно равному или по меньшей мере равному 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,9%, для периода времени от начала процесса или получения биологического образца и/или выделения, отбора, стимуляции и/или обогащения входных клеток из биологического образца до момента времени, когда выходные клетки выделяют для инфузии, включая время хранения криозамороженной композиции.

[0497] В некоторых вариантах осуществления изобретения процесс завершают в течение времени или периода времени, которое составляет или приблизительно составляет 35 дней, 34 дня, 33 дня, 32 дня, 31 день, 30 дней, 29 дней, 28 дней, 27 дней, 26 дней, 25 дней, 24 дня, 23 дня, 22 дня, 21 день, 20 дней, 19 дней, 18 дней, 17 дней, 16 дней, 15 дней, 14 дней, 13 дней, 12 дней, 11 дней, 10 дней, 9 дней или менее 9 дней, при доверительном интервале значений равному или приблизительно равному или по

меньшей мере равному 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,9%, для периода времени от получения биологического образца и/или выделения, отбора, стимуляции и/или обогащения Т-клеток, например, входных Т-клеток, из биологического образца, до момента времени, когда выходные клетки выделяют для инфузии, включая время хранения криозамороженной композиции.

[0498] В некоторых вариантах осуществления изобретения процесс завершают в течение времени или периода времени, которое составляет или приблизительно составляет 35 дней, 34 дня, 33 дня, 32 дня, 31 день, 30 дней, 29 дней, 28 дней, 27 дней, 26 дней, 25 дней, 24 дня, 23 дня, 22 дня, 21 день, 20 дней, 19 дней, 18 дней, 17 дней, 16 дней, 15 дней, 14 дней, 13 дней, 12 дней, 11 дней, 10 дней, 9 дней или менее 9 дней, при доверительном интервале значений равному или приблизительно равному или по меньшей мере равному 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,9%, для периода времени от получения биологического образца и/или выделения, отбора, стимуляции и/или обогащения Т-клеток, например, входных Т-клеток, из биологического образца, до момента времени, когда выходные клетки готовы для тестирования после получения препарата, включая время хранения криозамороженной композиции.

[0499] В некоторых вариантах осуществления изобретения продолжительность и/или время, необходимое для завершения процесса, составляет например от 10 до 35 дней, от 12 дней до 33 дней, от 17 дней до 25 дней, от 14 дней до 18 дней или от 19 дней до 23 дней, для случая, когда доля таких субъектов, которые имеют конкретное заболевание или показание, например, равна или по меньшей мере равна 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% или более 95% от всех субъектов. В некоторых вариантах осуществления среднее время и/или продолжительность времени, необходимое для завершения процесса (например, от получения пробы от субъекта до момента, когда продукт готов для введения или инфузии субъекту) в случае использования нескольких исходных композиций из различных биологических образцов, составляет от 15 до 27 дней, от 17 до 25 дней, от 14 до 18 дней, или от 19 до 23 дней или от 15 до 20 дней, или составляет приблизительно или менее 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней или 23 дней, с учетом времени хранения. В конкретных вариантах осуществления изобретения среднее время и/или продолжительность времени, необходимое для завершения процесса, когда используется несколько исходных композиций из различных биологических образцов, составляет от 15 до 27 дней, от 17 до 25 дней, от 14 до 18 дней, или от 19 до 23 дней, или составляет приблизительно или менее 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней или 23 дней, с учетом времени хранения и транспортировки. В конкретных вариантах осуществления изобретения среднее время и/или продолжительность времени, необходимое для завершения процесса, когда используется несколько исходных композиций из различных биологических образцов, составляет от 15 до 27 дней, от 17 до 25 дней, от 14 до 18 дней или от 19 до 23 дней, или составляет приблизительно или менее 14 дней, 15 дней, 16 дней,

17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней или 23 дней, с учетом времени хранения.

[0500] В некоторых вариантах осуществления изобретения продолжительность процесса, например, в отношении нескольких исходных композиций, таких как полученные из различных биологических образцов и/или от субъектов с различными заболеваниями, составляет менее или не более 21 день; в некоторых аспектах, такой результат достигается с уровнем успеха большим или приблизительно большим 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% в отношении изготовленного продукта из таких образцов и/или полученных от таких субъектов. В конкретных вариантах осуществления изобретения продолжительность процесса, например, в отношении исходных композиций, полученных например, из различных биологических образцов и/или от субъектов с различными заболеваниями, составляет от 14 дней до 18 дней; в некоторых аспектах такой результат достигается с уровнем успеха более 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% при изготовлении продукта, полученного с использованием таких образцов и/или от таких субъектов.

[0501] В некоторых вариантах осуществления изобретения продолжительность и/или время, необходимое для завершения процесса, составляет от 7 дней до 27 дней, от 9 до 25 дней, от 11 до 18 дней, от 14 до 18 дней, или от 11 до 15 дней, и при этом время хранения криогенно замороженных клеток не включено или не учитывается. В некоторых вариантах осуществления изобретения средняя продолжительность и/или время, нобходимое для завершения процесса в отношении нескольких композиций из различных биологических образцов, составляет от 7 до 27 дней, от 9 до 25 дней, от 11 до 18 дней, от 14 до 18 дней или от 11 до 15 дней, или равно, или меньше, или приблизительно составляет 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней или 18 дней, и при этом время хранения криогенно замороженных клеток не включено или не учитывается. В конкретных вариантах осуществления изобретения средняя продолжительность и/или время, необходимое для завершения процесса в отношении нескольких композиций из различных биологических образцов, составляет от 7 дней до 27 дней, от 9 до 25 дней, от 11 до 18 дней, от 14 до 18 дней или от 11 до 15 дней, или равно, или меньше, или приблизительно составляет 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней или 18 дней, и при этом время хранения криогенно замороженных клеток не включено или не учитывается. В некоторых вариантах осуществления средняя продолжительность и/или время, необходимое для завершения процесса в отношении нескольких композиций из различных биологических образцов, составляет менее 21 дня, не учитывая время хранения криогенно замороженных клеток.

0502] В конкретных вариантах осуществления изобретения время, необходимое для завершения процесса в отношении по меньшей мере 10% из нескольких композиций, полученных из различных источников, например различных биологических образцов и/или различных входных композиций обогащенных Т-клеток, выделенных, обогащенных и/или отобранных из различных биологических образцов, составляет от 7 до 18 дней, от

14 до 18 дней, от 10 дней до 17 дней, или от 11 до 15 дней, или составляет приблизительно 11 дней, 12 дней или 13 дней, когда время хранения криогенно замороженных клеток не включено или не учитывается. В конкретных вариантах осуществления изобретения время, необходимое для завершения процесса в отношении по меньшей мере 50% из нескольких композиций, полученных из различных биологических источников, составляет от 7 до 27 дней, от 9 до 25 дней, от 11 до 18 дней, от 14 до 18 дней, или от 11 до 15 дней, или составляет, или менее или приблизительно менее 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней или 18 дней, и при этом время хранения криогенно замороженных клеток не включено или не учитывается. В некоторых вариантах осуществления количество времени, необходимое для завершения процесса в отношении по меньшей мере 90% из нескольких композиций, полученных из различных биологических источников, составляет от 7 до 27 дней, от 9 до 25 дней, от 11 до 18 дней, от 14 до 18 дней или от 14 до 18 дней, от 11 до 15 дней, или составляет, или менее или приблизительно менее 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней или 18 дней, и при этом время хранения криогенно замороженных клеток не включено или не учитывается. В некоторых вариантах количество времени, необходимое для завершения процесса в отношении по меньшей мере 90% из нескольких композиций, полученных из различных источников, составляет менее 21 дня, и при этом время хранения криогенно замороженных клеток не учитывается.

[0503] В некоторых вариантах осуществления изобретения продолжительность и/или время процесса от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции, до момента времени, при котором достигается пороговое значение количества плотность и/или уровня размножения (такого как конкретное значение кратности размножение, такое как четырехкратное, или достижения заданной величины) при культивировании, составляет от 5 до 25 дней, от 7 до 18 дней, от 14 до 18 дней или от 8 до 15 дней, например, от 8 до 13 дней или от 9 до 13 дней. В некоторых вариантах осуществления среднее время и/или продолжительность процесса от начала или инициирования инкубирования до момента достижения пороговых показателей составляет от 5 до 25 дней, от 7 до 18 дней, от 14 до 18 дней, или от 9 до 13 дней, или составляет, или составляет менее или приблизительно менее 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней или 13 дней. В конкретных вариантах осуществления среднее время и/или продолжительность процесса от начала или инициирования инкубирования до момента достижения пороговых показателей составляет от 5 до 25 дней, от 7 до 18 дней, от 14 до 18 дней или от 9 до 13 дней, или равно или приблизительно равно 9 дням, 10 дням, 11 дням, 12 дням или 13 дням.

[0504] В некоторых вариантах осуществления изобретения время и/или продолжительность процесса от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции до момента времени, при котором достигается пороговое значение количества плотность и/или уровня размножения равно по меньшей мере или приблизительно равно по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%,

70%, 75%, 80%, 85% или 90% времени, требуемому для выполнения альтернативного способа. В конкретных вариантах осуществления изобретения продолжительность и/или время процесса от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции до времени, при котором достигается пороговое значение количества, плотности и/или уровня размножения во время культивирования, меньше продолжительности и/или времени выполнения альтернативного процесса, приблизительно, или по меньшей мере на 0,5 дней, 1 день, 1,5 дней, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней или более чем на 14 дней.

[0505] В некоторых вариантах осуществления изобретения время, необходимое по меньшей мере 10% из нескольких композиций, полученных из различных биологических образцов, которые достигают порогового значения количества, плотности и/или уровня размножения от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции до момента, когда они достигают пороговое значение количества, плотность и/или уровня размножения при течение культивирования, составляет от 5 до 20 дней, от 7 до 15 дней, или от 9 до 11 дней, или оно равно, меньше или приблизительно меньше 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней. В конкретных вариантах осуществления изобретения время, необходимое по меньшей мере 50% из нескольких композиций, полученных из различных биологических образцов, которые достигают порогового значения количества, плотности и/или уровня размножения от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции до момента, когда они достигают пороговое значение количества, плотность и/или уровня размножения при течение культивирования, составляет от 5 до 25 дней, от 7 до 18 дней, или от 9 до 13 дней, или оно равно, меньше или приблизительно меньше 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней или 13 дней. В некоторых вариантах время, необходимое для достижения по меньшей мере 90% из нескольких композиций, полученных из различных биологических образцов и которые достигают порогового значения количества, плотности и/или уровня размножения от начала или инициирования инкубирования в условиях стимуляции, до момента, когда они достигают пороговое значение, составляет от 5 до 25 дней, от 7 до 18 дней, или от 9 до 13 дней, или оно составляет или приблизительно составляет 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней или 13 дней.

[0506] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы используют для получения или изготовления выходных композиций сконструированных Т-клеток, которые пригодны для использования в клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения считается, что выходная композиция была успешно получена, если клетки композиции достигают порогового значения количества, плотности и/или уровня размножения клеток во время культивирования. В конкретных вариантах осуществления изобретения выходная композиция является успешно полученной, если по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% клеток экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления изобретения выходная композиция является успешно полученной или изготовленной, если выходная

композиция подходит для терапевтического применения, например, в качестве средства аутологичной клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления изобретения выходная композиция пригодна для терапевтического применения, если клетки выходных композиций удовлетворяют одному или нескольким критериям. В некоторых вариантах осуществления клетки и/или клеточные композиции, пригодные для использования в клеточной терапии, являются стерильными (например, не имеют обнаруживаемого микробного загрязнения), не содержат эндотоксина, не содержат репликационно-компетентного, жизнеспособного или активного вируса (например, они обладают цитолитической активностью и/или высвобождают цитокин в ответ на целевой антиген-мишень) и/или содержат большую часть клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

[0507] В некоторых вариантах осуществления изобретения часть, образец и/или долю выходных клеток собирают, например, до криогенного замораживания, и тестируют с помощью одного или нескольких анализов. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько анализов включают анализы по оценке выходных клеток, например оценки, определения и/или количественного определения признаков, фенотипов и/или характеристик выходных клеток, например, для определения или проверки безопасности и/или биологических характеристик выходных клеток. В некоторых вариантах осуществления один или несколько тестов могут включать анализы проверки того, что часть, образец и/или доля выходных клеток являются стерильными. В конкретных вариантах осуществления анализы включают тесты на наличие микробной контаминации, бактериальных эндотоксинов, остаточных реагентов и/или репликационно-компетентного вируса. В некоторых вариантах осуществления один или несколько тестов измеряют, детектируют и/или количественно определяют одну или несколько биологических характеристик. В некоторых вариантах осуществления один или несколько анализов измеряют, определяют и/или количественно определяют количество клеток, плотность клеток, фенотип клеток, например, поверхностную экспрессию CD3, CD4 и/или CD8, жизнеспособность и/или активность клеток, например, высвобождение цитокина и/или цитолитическую активность.

[0508] В конкретных вариантах осуществления один или несколько тестов выполняют до того, как выходные клетки выделяют для инфузии, готовы для введения субъекту и/или вводят субъекту. В конкретных вариантах осуществления изобретения выходные клетки выделяют для инфузии, они готовы для введения субъекту и/или их вводят субъекту после того, как был выполнен один или более анализов, например, в отношении части, фракции и/или пробе выходных клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения выходные клетки выделяют для инфузии, они готовы для введения субъекту и/или их вводят субъекту после того, как выходные клетки будут проанализированы и признаны как безопасные, например, стерильные и/или свободные от загрязнений, и/или что они имеют требуемые биологические характеристики после завершения одного или нескольких анализов.

[0509] В конкретных вариантах осуществления изобретения, предлагаемые способы обеспечивают успешное получение выходной композиции обогащенных Т-клеток из входной композиции клеток и/или биологического образца с вероятностью, составляющей по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 81%, по меньшей мере или приблизительно 82%, по меньшей мере или приблизительно 83%, по меньшей мере или приблизительно 84%,по меньшей мере или приблизительно 85%, 86%, по меньшей мере или приблизительно 87%, по меньшей мере или приблизительно 88%, по меньшей мере или приблизительно 89%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 91%, по меньшей мере или приблизительно 92%, по меньшей мере или приблизительно 93%, по меньшей мере или приблизительно 94%, по меньшей мере или приблизительно 95%по меньшей мере или приблизительно 96%, по меньшей мере или приблизительно 97%, по меньшей мере или приблизительно 98% или по меньшей мере или приблизительно 99% вероятности. В некоторых вариантах осуществления эта вероятность составляет от 85% до 100%, от 90% до 95% или от 92% до 94%. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложенные способы обеспечивают успешное получение выходной композиции обогащенных Т-клеток из нескольких образцов и/или из нескольких входных композиций с вероятностью, составляющей по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 81%, по меньшей мере или приблизительно 82%, по меньшей мере или приблизительно 83%, по меньшей мере или приблизительно 84%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 86%, по меньшей мере или приблизительно 87%, по меньшей мере или приблизительно 88%, по меньшей мере или приблизительно 89%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 91%, по меньшей мере или приблизительно 92%, по меньшей мере или приблизительно 93%, по меньшей мере или приблизительно 94%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 96%, по меньшей мере или приблизительно 97%, по меньшей мере или приблизительно 98%, или по меньшей мере или приблизительно 99%. В некоторых вариантах предложенные способы обеспечивают успешное получение выходной композиции обогащенных Т-клеток из нескольких образцов и/или из нескольких композиций входных клеток с долей, составляющей от или приблизительно от 85% до или приблизительно до 100%, от или приблизительно от 90% до или приблизительно до 95% или от или приблизительно от 92% до или приблизительно до 94% от всех обрабатываемых композиций.

[0510] В некоторых вариантах осуществления изобретения процесс успешно завершают в течение 21 дня для клеток, полученных, отобранных или обогащенных из по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или по меньшей мере 99,9% образцов, полученных от различных субъектов, при степени успеха заявленного способа, составляющего по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения, процесс успешно завершают в течение 21 дня для

клеток, полученных, отобранных или обогащенных из или по меньшей мере из 90%, из по меньшей мере или приблизительно 91%, из по меньшей мере или приблизительно 92%, из по меньшей мере или приблизительно 93%, из по меньшей мере или приблизительно 94%, из по меньшей мере или приблизительно 95%, из по меньшей мере или приблизительно 96%, из по меньшей мере или приблизительно 97%, из по меньшей мере или приблизительно 98% или из по меньшей мере или приблизительно 99% или из 100% образцов, полученных от различных субъектов. В некоторых вариантах способ имеет степень успеха, равную или по меньшей мере равную 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% для получения сконструированных клеток, готовых к инфузии субъекту в течение 21 дня после получения, отбора или обогащения клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления процесс завершают в течение 21 дня для клеток, полученных, отобранных или обогащенных из меньшей мере или приблизительно по меньшей мере из 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,9% образцов, полученных от различных субъектов, и при этом заявленный способ имеет степень успеха по меньшей мере равный 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более.

[0511] В конкретных вариантах осуществления изобретения процесс завершают в течение от 14 дней до 18 дней для клеток, полученных, отобранных или обогащенных по меньшей мере из 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,9% образцов, полученных от различных субъектов, и при этом способ имеет степень успеха по меньшей мере равный 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более. В некоторых вариантах процесс завершают в течение периода времени от 14 дней до 18 дней для клеток, полученных, отобранных или обогащенных по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере из 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,9% образцов, полученных от различных субъектов, и при этом заявленный способ имеет степень успеха по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более.

[0512] В конкретных вариантах осуществления изобретения процесс, связанный с представленными способами, имеет вероятность успешного образования или получения выходной композиции, которая больше, чем вероятность успешного образования или получения выходной композиции у альтернативного и/или аналогичного процесса по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 0,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 1%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 1,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 2%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 2,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 3%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 3,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 4,0%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 4,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 5,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 6%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 6,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 7%, по меньшей мере или приблизительно по

меньшей мере на 7,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 8%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 8,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 9%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 9,5%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере на 10% или более чем на 10%.

G Иллюстративные характеристики выходных композиций

[0513] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы используют в качестве процесса получения или приготовления выходных клеток и/или выходных композиций обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, выходные клетки и/или выходные композиции обогащенных Т-клеток представляют собой или включают клетки, которые собирают, выделяют, отбирают и/или обогащают из биологического образца, такого как образец крови или образец лейкафереза, инкубируют в условиях стимуляции; конструируют, например, трансдуцированием, чтобы включать или экспрессировать рекомбинантный полинуклеотид, например полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, такой как CAR; и культивируют до порогового значения количества, плотности или уровня размножения клеток; и/или приготавливают в виде препарата. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходную композицию предварительно криогенно замораживают и затем оттаивают, например, во время, до и/или после одной или нескольких стадий процесса. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит Т-клетки, например, CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, CAR.

[0514] В конкретных вариантах осуществления изобретения выходная композиция представляет собой композицию клеток, обогащенную CD3+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения, выходная композиция включает или содержит по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% или приблизительно 100% CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция состоит по существу из CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция представляет собой композицию клеток, обогащенную CD4+ Т-клетками и CD8+ Т-клетками. В конкретных вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит или включает по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% или приблизительно 100% клеток, которые представляют собой CD4+ или CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция состоит по существу из CD4+ и CD8+ Т-клеток.

[0515] В конкретных вариантах осуществления изобретения, выходная композиция содержит CD4+ Т-клетки в количестве, составляющем по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере от 10% до 90%, от 20% до 80%, от 25% до 75%, от 30% до 70%, от 35% до 65%, от 40% до 60%, от 45% до 55%, от 45% до 50%, или 50% или

приблизительно 50% CD4+ Т-клеток, и по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере от 10% до 90%, от 20% до 80%, от 25% до 75%, от 30% до 70%, от 35% до 65%, от 40% до 60%, от 45% до 55%, от 45% до 50%, или 50% или приблизительно 50% CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере от 35% до 65%, от 40% до от 45% до 55%, от 45% до 50%, или 50% или приблизительно 50% CD4+ Т-клеток, и по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере от 35% до 65%, от 40% до от 45% до 55%, от 45% до 50%, или 50% или приблизительно 50% CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления выходная композиция содержит от или приблизительно от 35% до или приблизительно до 65% CD4+ Т-клеток и от или приблизительно от 35% до или приблизительно до 65% CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения выходная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток равное от 3:1 до 1:3, от 2,5:1 до 1:2,5, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,4:1 до 1:1,4, от 1,3:1 до 1:1,3, от 1,2:1 до 1:1,2 или от 1,1:1 до 1:1,1. В некоторых вариантах осуществления выходная композиция клеток имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток равное или приблизительно равное 3:1, 2,8:1, 2,5:1, 2,25:1, 2:1, 1,8:1, 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, 1:1,8, 1:2, 1:2,25, 1:2,5, 1:2,8 или 1:3.

[0516] В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 97%, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 98% или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 99% выходных композиций, полученных описанными здесь способами, имеют соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 10:90 до 90:10, от 20:80 до 80:20, от 75:25 до 25:75, от 70:30 до 30:70, от 35:65 до 65:35, от 40:60 и 60:40, от 45:55 до 55:45, или приблизительно 50:50 или 50:50. В конкретных вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90% выходных композиций, полученных описанными здесь способами, имеют соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 3:1 до 1:3, от 2,5:1 до 1:2,5, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,4:1 до 1:1,4, от 1,3:1 до 1:1,3, от 1,2:1 до 1:1,2 или от 1,1:1 до 1:1,1. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 90% выходных композиций, полученных описанными здесь способами, имеют соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 1:2 до 2:1. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 90% выходных композиций, полученных описанными здесь способами, имеют соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,25:1 до 1:1,25, от 1,1:1 до 1:1,1.

[0517] В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, CAR, и CD8+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор,

например CAR, равное от 3:1 до 1:3, от 2,5:1 до 1:2,5, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,4:1 до 1:1,4, от 1,3:1 до 1:1,3, от 1,2:1 до 1:1,2 или от 1,1:1 до 1:1,1. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция клеток имеет соотношение равное или приблизительно равное 3:1, 2,8:1, 2,5:1, 2,25 1, 2:1, 1,8:1, 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, 1:1,8, 1:2, 1:2,25, 1:2,5, 1:2,8 или 1:3.

[0518] В конкретных вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 90% выходных композиций, полученных описанными здесь способами, имеют соотношение CD4+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, CAR, и CD8+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например CAR, равное от 3:1 до 1:3, от 2,5:1 до 1:2,5, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,4:1 до 1:1,4, от 1,3:1 до 1:1,3, от 1,2:1 до 1:1,2 или от 1,1:1 до 1:1,1. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 90% выходных композиций, полученных описанными здесь способами, имеют соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 1:2 до 2:1. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 90% выходных композиций, полученных описанными здесь способами, имеют соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,25:1 до 1:1,25, от 1,1:1 до 1:1,1.

[0519] В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция, получаемая или изготовленная представленными способами, содержит клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, например TCR или CAR. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия рекомбинантного рецептора может включать, без ограничения, продуцирование одного или нескольких рекомбинантных рецепторных белков, локализованных на клеточной мембране и/или клеточной поверхности клеток, имеющих обнаруживаемое количество рекомбинантного рецепторного белка, обнаруживаемое количество мРНК, кодирующей рекомбинантный рецептор, имеющих или содержащих рекомбинантный полинуклеотид, который кодирует рекомбинантный рецептор, и/или имеющих или содержащих мРНК или белок, который является суррогатным маркером экспрессии рекомбинантного рецептора.

[0520] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 45%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 65%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 97%, по меньшей мере или приблизительно 99% или более 99% клеток выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50% клеток выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно

30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 45%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 65%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 97%, по меньшей мере или приблизительно 99% или более 99% CD3+ Т-клеток выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50% CD3+ Т-клеток выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 45%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 65%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 97%, по меньшей мере или приблизительно 99% или приблизительно 99%, или более чем 99% CD4+ Т-клеток выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50% CD4+ Т-клеток выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 45%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 65%, по меньшей мере или приблизительно 70%по меньшей мере, на 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 97%, по меньшей мере или приблизительно 99%, или более чем 99% CD8+ Т-клеток выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50% CD8+ Т-клеток выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор.

[0521] В конкретных вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 99% или по меньшей мере

или приблизительно 99,9% жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит по меньшей мере или приблизительно 75% жизнеспособных клеток или приблизительно 75% жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90% или по меньшей мере или приблизительно 95% жизнеспособных клеток или приблизительно 95% или по меньшей мере или приблизительно 99,9% жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 99% или по меньшей мере или приблизительно 99,9% жизнеспособных CD3+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит по меньшей мере или приблизительно 75% жизнеспособных CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90% или по меньшей мере или приблизительно 95% жизнеспособных CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 99% или по меньшей мере или приблизительно 99,9% жизнеспособных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит по меньшей мере или приблизительно 75% жизнеспособных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90% или по меньшей мере или приблизительно 95% или по меньшей мере или приблизительно 95% жизнеспособных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления выходная композиция содержит по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 99% или по меньшей мере или приблизительно 99,9% жизнеспособных CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит по меньшей мере или приблизительно 75% жизнеспособных CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах выходная композиция содержит по меньшей мере или приблизительно 85%, по

меньшей мере или приблизительно 90% или по меньшей мере или приблизительно 95% жизнеспособных CD8+ Т-клеток или по меньшей мере или приблизительно 95% жизнеспособных CD8+ Т-клеток.

[0522] В конкретных вариантах осуществления изобретения выходные клетки имеют небольшую долю и/или небольшую часть клеток, которые подвергаются и/или примированы и/или находятся в состоянии апоптоза. В конкретных вариантах осуществления изобретения выходные клетки имеют небольшую долю и/или небольшую часть клеток, которые являются положительными по маркеру апоптоза. В некоторых вариантах выполнения менее или приблизительно менее 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, или менее или приблизительно менее 1% клеток выходной композиции экспрессируют, содержат и/или являются положительными по маркеру апоптоза. В некоторых вариантах осуществления менее или приблизительно менее 25% клеток выходной композиции экспрессируют, содержат и/или являются положительными по маркеру апоптоза. В некоторых вариантах осуществления менее или приблизительно менее 10% клеток выходной композиции экспрессируют, содержат и/или являются положительными по маркеру апоптоза.

[0523] В конкретных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 99%, или по меньшей мере или приблизительно 99,9% рекомбинантных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR+ клетки) выходной композиции являются жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90% или по меньшей мере или приблизительно 95% клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR+ клетки) композиции являются жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 90% клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR+ клетки), являются жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 99% или по меньшей мере или приблизительно 99,9% CD3+ Т-клеток выходной композиции являются

жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90% или по меньшей мере или приблизительно 95% CD3+ Т-клеток выходной композиции являются жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3). В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 90% CD3+ Т-клеток выходной композиции являются жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 99%, или по меньшей мере или приблизительно 99,9% рекомбинантных CD3+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептора (например, CAR+ клетки) выходной композиции являются жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3). В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90% или по меньшей мере или приблизительно 95% рекомбинантных CD3+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептора (например, CAR+ клетки) выходной композиции являются жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах по меньшей мере или приблизительно 90% % рекомбинантных CD3+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептора (например, CAR+ клетки) выходной композиции являются жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3).

[0524] В конкретных вариантах осуществления в среднем, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 99% или по меньшей мере или приблизительно 99,9% рекомбинантных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR+ клетки), нескольких выходных композиций, продуцируемых способом, описанным здесь, являются жизнеспособными клетками, например, клетками, негативными по маркеру апоптоза, такому как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления в среднем, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90% или по меньшей мере или приблизительно 95% клеток,

экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR+ клетки), в нескольких выходных композициях, полученных способом, описанным здесь, являются жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления в среднем, по меньшей мере или приблизительно 90% клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR+ клетки), в нескольких выходных композициях, полученных способом, описанным здесь, являются жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления изобретения, в среднем, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 99% или по меньшей мере или приблизительно 99,9% CD3+ Т-клеток нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, являются жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления в среднем,, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90% или по меньшей мере или приблизительно 95% CD3+ Т-клеток нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, являются жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3). В конкретных вариантах осуществления в среднем, по меньшей мере или приблизительно 90% CD3+ Т-клеток нескольких выходных композиций, продуцируемых способом, описанным здесь, являются жизнеспособными клетками, например клетками, негативными по маркеру апоптоза, таким как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления в среднем, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 99% или по меньшей мере или приблизительно 99,9% рекомбинантных CD3+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR+ клетки) нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, являются жизнеспособными клетками, например, клетками, негативными по маркеру апоптоза, такого как каспаза (например, активированная каспаза-3). В конкретных вариантах осуществления в среднем, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% рекомбинантных CD3+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR+ клетки) нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, являются жизнеспособными клетками,

например, клетками, негативными по маркеру апоптоза, такого как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления в среднем по меньшей мере 90% рекомбинантных CD3+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR+ клетки) нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, являются жизнеспособными клетками, например, клетками, негативными по маркеру апоптоза, такого как каспаза (например, активированная каспаза-3). В любом из вариантов осуществления изобретения несколько выходных композиций, полученных способом, описанным в настоящем документе, может быть получено от одного и того же или различных доноров. В некоторых аспектах по меньшей мере две в нескольких выходных композициях получены от различных доноров. В некоторых аспектах каждая в нескольких выходных композициях получена от одного из группы различных доноров, например от приблизительно 2, приблизительно 5, приблизительно 10, приблизительно 15, приблизительно 20, приблизительно 25, приблизительно 30, приблизительно 35, приблизительно 40, приблизительно 45, приблизительно 50, приблизительно 55, приблизительно 60 или более чем приблизительно 60 различных доноров, например пациентов, нуждающихся в клеточной терапии, такой как клеточная терапия с использованием CAR Т-клеток.

[0525] В конкретных вариантах осуществления изобретения большинство клеток выходной композиции являются наивными клетками, клетками центральной памяти и/или клетками эффекторной памяти. В конкретных вариантах осуществления большинство клеток выходной композиции представляют собой наивные клетки или клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления большинство клеток выходной композиции являются клетками центральной памяти. В некоторых аспектах менее дифференцированные клетки, например, клетки центральной памяти, являются более долгоживущими и они медленнее истощаются, увеличивая тем самым персистентность и длительность действия. В некоторых аспектах, респондер клеточной терапии, такой как CAR Т-клеточной терапии, имеет повышенную экспрессию генов центральной памяти. См. например, Fraletta et al. (2018) Nat Med. 24 (5):563-571.

[0526] В некоторых вариантах осуществления клетки выходной композиции имеют большую часть и/или большую долю клеток центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, или более 95% клеток выходной композиции представляют собой клетки с фенотипом памяти, фенотипом центральной памяти, или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, или по меньшей мере или приблизительно 65% клеток выходной

композиции представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления изобретения от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 65%, от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 45%, от или приблизительно от 45% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 50% до или приблизительно до 55%, от или приблизительно от 55% до или приблизительно до 60% или от или приблизительно от 60% до или приблизительно до 65% Т-клеток выходной композиции имеют фенотип памяти, фенотип центральной памяти или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, или более 95% Т-клеток выходной композиции имеют фенотип памяти, фенотип центральной памяти или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, или по меньшей мере или приблизительно 65% Т-клеток выходной композиции имеют фенотип памяти, фенотип центральной памяти или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 65%, от или приблизительно от 40%, до или приблизительно до 45%, от или приблизительно от 45% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 50% до или приблизительно до 55%, от или приблизительно от 55% до или приблизительно до 60%, или от или приблизительно от 60% до или приблизительно до 65% Т-клеток выходной композиции представляют собой клетки с фенотипом памяти, фенотипом центральной памяти или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, или более 95% CD4+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CD4+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, или по меньшей мере или приблизительно 65% CD4+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CD4+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 65%, от или приблизительно от 40%, до или приблизительно до 45%, от или приблизительно от 45% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 50% до или

приблизительно до 55%, от или приблизительно от 55% до или приблизительно до 60%, или от или приблизительно от 60% до или приблизительно до 65% CD4+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CD4+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95% или более 95% CD4+ CAR+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CD4+ CAR+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, или по меньшей мере или приблизительно 65% CD4+ CAR+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CD4+ CAR+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 65%, от или приблизительно от 40%, до или приблизительно до 45%, от или приблизительно от 45% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 50% до или приблизительно до 55%, от или приблизительно от 55% до или приблизительно до 60%, или от или приблизительно от 60% до или приблизительно до 65% CD4+ CAR+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CD4+ CAR+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, или более 95% CD8+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CD8+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, или по меньшей мере или приблизительно 65% CD8+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CD8+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 65%, от или приблизительно от 40%, до или приблизительно до 45%, от или приблизительно от 45% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 50% до или приблизительно до 55%, от или приблизительно от 55% до или приблизительно до 60%, или от или приблизительно от 60% до или приблизительно до 65% CD8+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CD8+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или

приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, или более 95% CD8+ CAR+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CD8+ CAR+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, или по меньшей мере или приблизительно 65% CD8+ CAR+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CD8+ CAR+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 65%, от или приблизительно от 40%, до или приблизительно до 45%, от или приблизительно от 45% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 50% до или приблизительно до 55%, от или приблизительно от 55% до или приблизительно до 60%, или от или приблизительно от 60% до или приблизительно до 65% CD8+ CAR+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CD8+ CAR+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, или более 95% CAR+ Т-клеток (например, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток) выходной композиции представляют собой CD4+ или CD8+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, или по меньшей мере или приблизительно 65% Т-клеток (например, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток) выходной композиции представляют собой CD4+ или CD8+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, или более 95% клеток в композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B- и/или CD127+ клетки. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, или по меньшей мере приблизительно 65% CAR+ Т-клеток в композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B- и/или CD127+ клетки.

[0527] В некоторых вариантах осуществления итерации способа приводят к получению нескольких выходных композиций, необязательно из биологических образцов

человека, где способ осуществляют в отношении нескольких различных отдельных субъектов. В некоторых вариантах осуществления средняя доля или средний процент клеток с фенотипом памяти в нескольких выходных композициях находится в интервале от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 65%, от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 45%, от или приблизительно от 45% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 50% до или приблизительно до 55%, от или приблизительно от 55% до или приблизительно до 60%, от или приблизительно 60% до или приблизительно до 65%. В некоторых вариантах осуществления средняя доля или средний процент клеток с фенотипом центральной памяти в нескольких выходных композициях находится в интервале от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 65%, от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 45%, от или приблизительно от 45% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 50% до или приблизительно до 55%, от или приблизительно от 55% до или приблизительно до 60%, или от или приблизительно от 60% до или приблизительно до 65%. В некоторых вариантах осуществления средняя доля или средний процент клеток, которые представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B- и/или CD127+ в нескольких выходных композициях находится от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 65%, от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 45%, от или приблизительно от 45% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 50% до или приблизительно до 55%, от или приблизительно от 55% до или приблизительно до 60%, от или приблизительно 60% до или приблизительно до 65%. В некоторых вариантах осуществления средняя доля или средний процент клеток, которые представляют собой CCR7+/CD45RA- или CCR7+/CD45RO+ в нескольких выходных композициях, находится от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 65%, от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 45%, от или приблизительно от 45% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 50% до или приблизительно до 55%, от или приблизительно от 55% до или приблизительно до 60%, от или приблизительно 60%, или приблизительно или приблизительно 65%. В некоторых вариантах осуществления среднее или медианное значение процентной доли CD4+ Т-клеток центральной памяти в сконструированных CD4+ Т-клетках (например, CAR+ CD4+ Т-клетках) в нескольких выходных композициях находится от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 65%, от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 45%, от или приблизительно от 45% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 50% до или приблизительно до 55%, от или приблизительно от 55% до или приблизительно до 60% или от или приблизительно от 60% до или приблизительно до 65%. В некоторых вариантах осуществления среднее или медианное значение процентной доли CD8+ Т-клеток центральной памяти в сконструированных CD8+ Т-клетках (например, CAR+ CD8+ Т-клетках) в нескольких выходных композициях находится от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 65%, от или приблизительно от 40% до или

приблизительно до 45%, от или приблизительно от 45% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 50% до или приблизительно до 55%, от или приблизительно от 55% до или приблизительно до 60% или от или приблизительно от 60% до или приблизительно до 65%. В некоторых вариантах осуществления среднее или медианное значение процентной доли Т-клеток с центральной памятью (например, CD4+ Т-клеток с центральной памятью и CD8+ Т-клеток с центральной памятью) в полученных Т-клетках (например, CAR+ Т-клетках) в нескольких выходных композициях находится от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 65%, от или приблизительно от 40% до или приблизительно до 45%, от или приблизительно от 45% до или приблизительно до 50%, от или приблизительно от 50% до или приблизительно до 55%, от или приблизительно от 55% до или приблизительно до 60%, или от или приблизительно от 60% до или приблизительно до 65%.

[0528] В некоторых вариантах осуществления изобретения в среднем по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, или более или приблизительно более 95% клеток нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, являются клетками с фенотипом памяти, которые представляют собой Т-клетки с фенотипом центральной памяти или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления в среднем по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно или приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60% или меньшей мере приблизительно 65% клеток нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, представляют собой Т-клетки с фенотипом центральной памяти или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления изобретения в среднем по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, или более или приблизительно более 95% клеток нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B- и/или CD127+ клетки. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60% или по меньшей мере приблизительно 65% клеток нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B- и/или CD127+ клетки. В

некоторых вариантах осуществления изобретения в среднем, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно или приблизительно 95%, или более приблизительно 95% Т-клеток нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, представляют собой Т-клетки с фенотипом центральной памяти или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления в среднем по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60% или по меньшей мере приблизительно 65% Т-клеток нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, представляют собой Т-клетки с фенотипом центральной памяти или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления изобретения в среднем по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно более 95% Т-клеток нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, представляют собой CD4+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления в среднем по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 65% CD4+ Т-клеток нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, представляют собой CD4+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления изобретения в среднем по меньшей мере или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95% или более 95% CD8+ Т-клеток нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, представляют собой CD8+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в среднем по меньшей мере или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95% или более или приблизительно более 95% CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток нескольких выходных

композиций, полученных способом, описанным здесь, представляют собой CD4+ или CD8+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления в среднем по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно или приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 65% CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток нескольких выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, представляют собой CD4+ или CD8+ Т-клетки центральной памяти. В любом из вариантов осуществления изобретения несколько выходных композиций, полученных способом, описанным здесь, получены из источника, относящегося к одному или различным донорам. В некоторых аспектах по меньшей мере две в нескольких выходных композициях получены от различных доноров. В некоторых аспектах каждую в нескольких выходных композициях получают из одного из группы различных доноров, например от приблизительно 2, приблизительно 5, приблизительно 10, приблизительно 15, приблизительно 20, приблизительно 25, приблизительно 30, приблизительно 35, приблизительно 40, приблизительно 45, приблизительно 50, приблизительно 55, приблизительно 60 или более чем приблизительно 60 различных доноров, в частности, пациентов, нуждающихся в клеточной терапии, такой как клеточная терапия CAR Т-клетками.

[0529] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции имеют небольшую долю и/или небольшую часть клеток, которые истощены и/или являются состарившимися. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции имеют небольшую долю и/или небольшую часть клеток, которые истощены и/или состарены. В некоторых вариантах осуществления их количество менее или приблизительно 40%, менее или приблизительно 35%, менее или приблизительно 30%, менее или приблизительно 25%, менее или приблизительно 20%, менее или приблизительно 15%, менее или приблизительно 10%, менее или приблизительно 5% или менее или приблизительно 1% от количества клеток выходной композиции. В некоторых вариантах осуществления менее или приблизительно 25% клеток выходной композиции являются истощенными и/или состарившимися. В некоторых вариантах осуществления менее, или приблизительно менее, или приблизительно 10% клеток выходной композиции являются истощенными и/или состарившимися.

[0530] В некоторых вариантах осуществления клетки выходной композиции имеют небольшую долю и/или небольшую часть клеток, которые являются негативными по экспрессии CD27 и CD28, например, поверхностной экспрессии. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции имеют набольшую долю и/или небольшую часть CD27-CD28-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения в выходной композиции менее или приблизительно 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или менее или приблизительно 1% клеток выходной композиции являются CD27-CD28-клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения в выходной композиции менее или приблизительно 25% клеток выходной композиции являются

CD27-CD28-клетками. В некоторых вариантах менее, или приблизительно или приблизительно менее 10% клеток выходной композиции являются CD27-CD28-клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее или приблизительно 5% клеток выходной композиции являются CD27-CD28-клетками.

[0531] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции имеют большую часть и/или большую долю клеток, которые являются положительными по экспрессии CD27 и CD28, например, поверхностной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции имеют большую часть и/или большую долю CD27+ CD28+ клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 75%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 85%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95% или более или приблизительно более 95% клеток выходной композиции представляют собой CD27+ CD28+ клетки. В некоторых вариантах выполнения менее или приблизительно менее 25% клеток выходной композиции являются CD27-CD28-клетками. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 50% клеток выходной композиции представляют собой CD27+ CD28+ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере или приблизительно 75% клеток выходной композиции представляют собой CD27+ CD28+ клетки.

[0532] В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции имеют набольшую долю и/или небольшую часть клеток, которые являются клетками T_{EMRA}. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции имеют набольшую долю и/или небольшую часть клеток T_{EMRA}. В некоторых вариантах осуществления менее или приблизительно 40%, менее или приблизительно 35%, менее или приблизительно 30%, менее или приблизительно 25%, менее или приблизительно 20%, менее или приблизительно 15%, менее или приблизительно 10%, менее или приблизительно 5% или менее или приблизительно 1% клеток выходной композиции являются клетками T_{EMRA}. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее или приблизительно 25% клеток выходной композиции являются клетками T_{EMRA}. В некоторых вариантах осуществления менее или приблизительно 10% клеток выходной композиции являются клетками T_{EMRA}. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее или приблизительно 5% клеток выходной композиции являются клетками T_{EMRA}.

[0533] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции имеют набольшую долю и/или небольшую часть клеток, которые являются негативными по CCR7 и положительными по экспрессии CD45RA, например, поверхностной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления клетки выходной композиции имеют набольшую долю и/или небольшую часть CCR7-CD45RA+ клеток. В

конкретных вариантах осуществления менее или приблизительно 40%, менее или приблизительно 35%, менее или приблизительно 30%, менее или приблизительно 25%, менее или приблизительно 20%, менее или приблизительно 15%, менее или приблизительно 10%, менее или приблизительно 5%, или менее или приблизительно 1% клеток выходной композиции представляют собой CCR7-CD45RA+ клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения менее или приблизительно 25% клеток выходной композиции представляют собой CCR7-CD45RA+ клетки. В конкретных вариантах осуществления менее чем приблизительно или приблизительно менее или приблизительно 10% клеток выходной композиции представляют собой CCR7-CD45RA+ клетки. В некоторых вариантах осуществления менее или приблизительно 5% клеток выходной композиции представляют собой CCR7-CD45RA+ клетки.

[0534] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции имеют сходную продукцию цитокинов в ответ на стимуляцию антигенами, как и выходные клетки, получаемые альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления клетки выходной композиции имеют сходное продукцию цитокина, например TNF-альфа, IFN-гамма и/или IL-2, в ответ на стимуляцию антигеном, как и выходные клетки, получаемые типовым альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления клетки выходной композиции в ответ на стимуляцию антигеном по меньшей мере продуцируют один или нескольких цитокинов на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150% больше, или в 1, 2, 3, 4 или 5 раз больше, чем клетки, полученные альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления изобретения продуцирование цитокина может быть измерено или оценено известными стандартными методиками, включая, но без ограничения, способы обнаружения на основе ELISA и/или с использованием антител.

[0535] В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции имеют сходную часть, процентную долю и/или количество клеток, которые продуцируют один или несколько цитокинов в ответ на стимуляцию антигеном как часть, процентная доля и/или количество выходных клеток, полученных альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления приблизительно или по меньшей мере 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% клеток выходной композиции продуцируют один или несколько цитокинов, например, TNF-альфа, IFN-гамма и/или IL-2 в ответ на стимуляцию антигеном. В конкретных вариантах осуществления изобретения, часть, процентная доля и/или количество клеток выходной композиции, которые продуцируют один или несколько цитокинов, составляет приблизительно или по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150% больше, или в 1, 2, 3, 4 или 5 раз большую часть, процент и/или количество выходных клеток, которые продуцирует один или несколько цитокинов, полученных альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления часть, процентная доля и/или количество клеток, которые продуцируют цитокин, могут быть

измерены или оценены любым известным или стандартным методом, включая анализы внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS).

[0536] В конкретных вариантах осуществления изобретения выходная композиция содержит функциональные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, продуцируют один или несколько цитокинов в ответ на стимуляцию антигеном. В некоторых вариантах осуществления один или несколько цитокинов включают, без ограничения, IL-2, TNF-альфа и/или IFN-гамма. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции, например, образец и/или часть выходных клеток тестируют, оценивают и/или измеряют в отношении функции и/или активности, стимулированной антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки тестируют в отношении продукции цитокинов после или во время стимуляции антигеном любым известным анализом, способным измерять продукцию, экспрессию и/или секрецию цитокинов. В некоторых вариантах осуществления клетки тестируют с помощью анализа внутреннего окрашивания цитокинов (ICS). В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 25% CD4+ клеток и по меньшей мере 15% CD8+ клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, являются положительными по IL-2 после стимуляции антигеном, при измерении методом ICS. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5% CD4+ клеток и по меньшей мере 5% CD8+ клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, являются положительными по IFN-гамма после стимуляции антигеном, при измерении методом ICS. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 40% CD4+ клеток и по меньшей мере 20% CD8+ клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, являются положительными для TNF-альфа после стимуляции антигеном, при измерении методом ICS. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 2,5% CD4+ клеток и по меньшей мере 2% CD8+ клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, являются положительными для всех IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа после стимуляции антигеном, при измерении методом ICS.

[0537] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере часть клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, продуцируют один или несколько цитокинов в ответ на активацию или стимуляцию, например, общую активацию или стимуляцию, активацию Т-клеток или стимуляцию, и/или активацию, или стимуляцию PMA и иономицином. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько цитокинов включают, без ограничения, IL-2, TNF-альфа и/или IFN-гамма. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции, например, образец и/или часть выходных клеток тестируют, оценивают и/или измеряют в отношении функции и/или активности путем активации или стимуляции, например, с использованием PMA и иономицина. В некоторых вариантах осуществления клетки тестируют в отношении продукцию цитокинов после или во время активации или стимуляции любым известным анализом, способным измерять продукцию цитокинов,

экспрессию и/или секрецию, например, с помощью ICS-анализа. В некоторых вариантах осуществления клетки стимулируют PMA и иономицином и оценивают с помощью анализа методом ICS. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% CD4+ клеток и по меньшей мере 25% CD8+ клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, являются положительными по IL-2 после стимуляции или активации PMA и иономицином, при измерении методом ICS. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30% CD4+ клеток и по меньшей мере 10% CD8+ клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, являются положительными по IFN-гамма после стимуляции или активации PMA и иономицином, при измерении методом ICS. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% CD4+ клеток и по меньшей мере 15% CD8+ клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, являются положительными по TNF-альфа после стимуляции или активации PMA и иономицином, при измерении методом ICS. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10% CD4+ клеток и по меньшей мере 5% CD8+ клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, являются положительными для всех IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа после стимуляции или активации PMA и иономицином, при измерении методом ICS.

[0538] В некоторых вариантах осуществления изобретения введение клеток выходной композиции субъекту, например субъекту с заболеванием или состоянием, таким как рак, повышает вероятность выживания. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки выходной композиции вводят субъекту с заболеванием или состоянием, у которого вероятность выживания в течение, приблизительно или по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или в течение 1, 2, 3, 4, 5, 10 или более 10 лет, составляет по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение клеток выходной композиции обеспечивает по меньшей мере увеличение вероятности выживания на 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, или по меньшей мере в 1, 2, 3, 4 или 5 раз выше, чем вероятность выживания, достигаемая в случае использования выходных клеток, полученных альтернативным способом.

[0539] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции вводят для лечения заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или состояние представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, содержащие выходные композиции, вводят субъекту, и у субъекта происходит уменьшение количества злокачественных клеток и/или объема опухоли. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеет место уменьшение количества раковых клеток и/или снижение объема опухоли на, приблизительно на или по меньшей мере на 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% после введения клеток выходной композиции, по сравнению с количеством раковых клеток и/или объемом опухоли у субъекта до

введения. В некоторых вариантах осуществления введение клеток выходной композиции приводит к более высокому уменьшению объема опухоли и/или количества раковых клеток у субъекта по сравнению с уменьшением объема опухоли и/или количества раковых клеток у субъекта после введения выходных клеток, полученных типовым альтернативным способом. В конкретных вариантах осуществления, введение клеток выходной композиции приводит к увеличению величины уменьшения объема опухоли и/или количества раковых клеток у субъекта, на, приблизительно на или по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, или в 1, 2, 3, 4 или 5 раз по сравнению с уменьшением объема опухоли и/или количества раковых клеток у субъекта после введения выходных клеток, полученных с помощью типового альтернативного способа.

[0540] В конкретных вариантах осуществления изобретения субъекту вводят клетки выходной композиции, например часть и/или дозу клеток выходной композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект, которому вводят клетки выходной композиции, имеет вероятность достижения и/или получения полного ответа (CR). В некоторых вариантах осуществления изобретения, вероятность достижения и/или получения CR составляет по меньшей мере или приблизительно 10%, по меньшей мере или приблизительно 15%, по меньшей мере или приблизительно 20%, по меньшей мере или приблизительно 25%, по меньшей или приблизительно 30%, по меньшей мере или приблизительно 35%, по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 45%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 90% или по меньшей мере или приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления вероятность достижения и/или получения CR составляет по меньшей мере или приблизительно 25%. В конкретных вариантах осуществления вероятность достижения CR составляет по меньшей мере или приблизительно 50%.

[0541] В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект, который вводят в виде клеток выходной композиции, имеет вероятность достижения и/или получения ORR. В некоторых вариантах осуществления, вероятность достижения и/или получения ORR составляет по меньшей мере или приблизительно 40%, по меньшей мере или приблизительно 45%, по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 55%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления вероятность достижения и/или получения ORR составляет по меньшей мере или приблизительно 80%. В конкретных вариантах осуществления вероятность достижения ORR составляет по меньшей мере или приблизительно 90%. В некоторых вариантах осуществления вероятность достижения ORR равна или составляет приблизительно 100%.

[0542] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность выходных клеток, например как вероятность того, что субъект будет достигать и/или получать CR или ORR после введения клеток выходной композиции, является большей, чем эффективность композиции, содержащей терапевтические клетки экспрессирующие рекомбинантного рецептора, полученные альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления изобретения вероятности достижения CR или ORR после введения выходных клеток по изобретению выше по меньшей мере на или приблизительно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, или в 1, 2, 3, 4 или 5 раз выше по сравнению с введением терапевтических клеток композиции, полученной альтернативным способом.

[0543] В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции имеют сходную цитолитическую активность в отношении клеток, экспрессирующих антиген, связанный и/или распознаваемый рекомбинантным рецептором (например, клетками-мишенями), как и в случае выходных клеток, полученных типовым альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления, когда клетки выходной композиции действуют на клетки, которые экспрессируют антиген, например, на клетки-мишени, клетки выходной композиции приводят к гибели по меньшей мере или приблизительно 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% клеток, которые экспрессируют антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки выходной композиции приводят к гибели большего количества клеток, которое по меньшей мере или приблизительно на 25%, 50%, 75%, 100%, 150% больше, или в 1, 2 , 3, 4 или 5 раз больше количества клеток, которые экспрессируют антиген, например, клетки-мишени, чем в случае использования выходных клеток, полученных альтернативным способом, при аналогичных условиях или таких же условиях.

[0544] В некоторых вариантах осуществления изобретения выходные клетки, полученные описанными здесь способами, имеют высокую и/или относительно высокую степень безопасности. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъекту вводят клетки выходной композиции, например часть и/или дозу клеток выходной композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект, которому вводят клетки выходной композиции, имеет меньший риск или вероятность возникновения эффектов токсичности, например, CRS или нейротоксичности, менее или приблизительно менее 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%. В некоторых вариантах осуществления изобретения токсичность представляет собой любую степень нейротоксичности или CRS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вводимые клетки композиции по изобретению вызывают риск или вероятность проявления любой степени CRS или нейротоксичности менее 80%. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения вводимые клетки выходной композиции вызывают риск или вероятность проявления любой степени CRS или нейротоксичности менее 80%.

[0545] В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект, которому вводят клетки выходной композиции, имеет риск или вероятность, меньше, чем по меньшей мере или приблизительно 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%. В некоторых вариантах осуществления изобретения вводимые клетки композиции по изобретению вызывают риск или вероятность появления CRS 3 или более высокой степени менее 10%. В некоторых вариантах осуществления изобретения вводимые клетки композиции по изобретению вызывают риск или вероятность появления CRS степени 3 или более высокой степени менее 5%.

[0546] В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект, которому вводят клетки выходной композиции, имеет риск или вероятность возникновения 3 или более высокой степени нейротоксичности, которая меньше, чем по меньшей мере или приблизительно 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%, или которая равна или приблизительно равна 0%, и/или является незначительной. В некоторых вариантах осуществления изобретения вводимые клетки композиции по изобретению вызывают риск или вероятность проявления 3 или более высокой степени нейротоксичности, составляющей менее 5%. В некоторых вариантах осуществления изобретения вводимые клетки конечной композиции вызывают риск или вероятность проявления 3 или более высокой степени нейротоксичности равный или прблизительно равнй 0% и/или незначительный риск возникновения нейротоксичности.

II. Состав бессывороточной среды и ее компоненты

[0547] Настоящее изобретение относится к бессывороточной среде, содержащей 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. Настоящее изобретение также относится к жидкой базальной среде, содержащей по меньшей мере одну синтетическую аминокислоту (например, дипептидную форму L-глутамина, например L-аланил-L-глутамин), где базальная среда не содержит свободной формы глутамина (т.е., L-глутамина), и белок. Настоящее изобретение также относится к замороженной добавке, содержащей свободную форму глутамина (то есть L-глутамин), и в некоторых случаях по меньшей мере один белок, такой как белок, заменяющий сыворотку. Могут быть введены одна или несколько дополнительных добавок, включая одну или несколько добавок, содержащих по меньшей мере один белок, такой как белок, заменяющий сыворотку, или один или несколько других компонентов, поддерживающих рост и размножение клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация синтетической аминокислоты (например, дипептидной формы L-глутамина, например L-аланил-L-глутамина) составляет от или приблизительно от 0,5 мМ до или приблизительно до 5 мМ (например, 2 мМ). В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина находится в диапазоне от или приблизительно от 0,5 мМ до или приблизительно до 5 мМ (например, 2 мМ). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок представляет собой белок человека или рекомбинантный белок, такой как белок, заменяющий

сыворотку, например альбумин. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда дополнительно содержит один или несколько цитокинов (таких как IL-2, IL-7 или IL-15). В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда, не содержит фенолового красного.

[0548] В некоторых вариантах осуществления изобретенния бессывороточную среду получают или готовят из жидкой базальной среды и одной или нескольких добавок.

[0549] В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается жидкая базальная среда, содержащая синтетическую аминокислоту, которая способна превращаться в L-глутамин в клеточной культуре, такую как синтетическая аминокислота, которая представляет собой дипептидную форму L-глутамина, например L-аланил-L-глутамин. В некоторых случаях базальная среда не содержит L-глутамина и белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация синтетической аминокислоты (например, дипептидной формы L-глутамина, например L-аланил-L-глутамина) составляет от или приблизительно от 0,5 мМ до или приблизительно до 5 мМ (например, 2 мМ). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок представляет собой белок, полученный от человека, рекомбинантный белок или оба белка. В некоторых вариантах осуществления базальная среда не содержит фенолового красного.

[0550] В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается добавка, содержащая по меньшей мере один белок и свободную форму глутамина, например L-глутамина, где добавка заморожена, или она заморожена после включения в нее L-глутамина в качестве компонента. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация L-глутамина в добавке составляет менее 200 мМ, в частности, менее 150 мМ, 100 мМ или менее, такую как от 20 мМ до 120 мМ, или от 40 мМ до 100 мМ, равную или приблизительно равную 80 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина после введения добавки в базальную среду составляет от приблизительно 0,5 мМ до приблизительно 5 мМ (например, 2 мМ). В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один белок не относится к белкам, полученным из источника, не относящегося к млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один белок является белком человека, или белком, полученным от человека, или является рекомбинантным белком. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок включает альбумин, например человеческий или рекомбинантный человеческий альбумин.

А. Базальная среда

[0551] В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда содержит аминокислоту. В некоторых вариантах аминокислота представляет собой 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.

[0552] В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда содержит по меньшей мере одну синтетическую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота способна превращаться в свободную форму глутамина (то есть в L-глутамин) в культуре, содержащей клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой человеческую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой генетически сконструированную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой генетически сконструированную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетку генетически конструируют для экспрессии рекомбинантного рецептора (например, химерного рецептора антигена). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой Т-клетку, экспрессирующую химерный рецептор антигена (CAR).

[0553] В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота представляет собой стабилизированную форму глутамина (то есть L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота является более стабильной, чем глутамин (то есть L-глутамин) в водном растворе (например, в базальной среде). В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота не образует значительного количества глутамина в базальной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует значительного количества пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует значительного количества глутамина (то есть 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 значительного количества глутамина (то есть 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 значительного количества глутамина (то есть 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 значительного количества глутамина (то есть 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 значительного количества 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 значительного количества 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 значительного количества

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 значительного количества пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет в базальной среде.

[0554] В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота растворима в водном растворе (например, базальной среде). В некоторых вариантах осуществления растворимость синтетической аминокислоты в водном растворе выше, чем свободная форма глутамина (т.е. L-глутамина).

[0555] В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота способна транспортироваться в клетку, где она может превращаться в свободную форму глутамина (то есть в L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой генетически сконструированную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой генетически сконструированную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетку генетически конструируют для экспрессии рекомбинантного рецептора (например, химерного рецептора антигена). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой Т-клетку, экспрессирующую химерный рецептор антигена (CAR).

[0556] В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота представляет собой дипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота представляет собой трипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота представляет собой дипептидную форму L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамин).

[0557] В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в базальной среде равна или приблизительно равна 0,5 мМ - 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в базальной среде составляет по меньшей мере 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) равна или приблизительно равна 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-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 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, L5mM-2 мМ, L5mM-2,5 мМ, L5mM-3 мМ, L5mM-3,5 мМ, L5mM-4 мМ, L5mM-4,5 мМ,

L5mM-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, включительно для всех значений. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в базальной среде равна или приблизительно равна 5 мМ-7,5 мМ, 5 мМ-10 мМ, 5 мМ-1, 5 мМ, 5 мМ-1 мМ, 5 мМ-1, 5 мМ, 5 мМ-20 мМ, 7,5 мМ-10 мМ, 7,5 мМ-1, 5 мМ, 7,5 мМ-1 мМ, 7,5 мМ-1, 5 мМ, 7,5 мМ-20 мМ, 10 мМ-1, 5 мМ, 10 мМ-1 мМ, 10 мМ-1 мМ, 10 мМ-20 мМ, 1 мМ-20 мМ, 1 мМ-1 мМ, 1 мМ-20 мМ или 1 мМ-20 мМ, включительно для всех значений. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация дипептидной формы L-глутамина (например,L-аланил-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 изобретения концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в базальной среде равна или приблизительно равна 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в базальной среде составляет не более 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 мМ 5 мМ, 8 мМ, 8,5 мМ, 9 мМ, 9,5 мМ, 10 мМ, 1 мМ, 5 мМ, 1 мМ, 10 мМ или 20 мМ.

[0558] В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда не содержит L-глутамина или не содержит значительного количества L-глутамина. В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда содержит L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация L-глутамина в базальной среде равна или приблизительно равна, или менее или приблизительно менее 0,1 мМ, 0,2 мМ, 0,3 мМ, 0,4 мМ или 0,5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в базальной среде равна или приблизительно равна, или менее или приблизительно менее 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ или 5 мМ

[0559] В некоторых вариантах осуществления изобретения в базальной среде присутствует одна или несколько аминокислот, включая по меньшей мере одну синтетическую аминокислоту, которая способна превращаться в свободную форму глутамина (то есть в L-глутамин), например, в дипептидную форму L-глутамина, такого как L-аланил-L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления базальная среда представляет собой искусственную или синтетическую среду. В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда представляет собой сбалансированный солевой раствор (например, PBS, DPBS, HBSS, EBSS). В некоторых вариантах осуществления базальная среда выбрана из модифицированной по Дульбекко среды Игла (DMEM), минимальной эссенциальной среды (MEM), базальной среды Игла (BME), среды F-10, F-12, RPMI 1640, минимальной эссенциальной среды Глазго (GMEM), минимальной эссенциальной среды альфа-MEM (альфа-MEM), модифицированной по Дульбекко среды

Искова и среды M199. В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда представляет собой сложную среду (например, RPMI-1640, IMDM). В некоторых вариантах базальная среда представляет собой базальную среду для размножения Т-клеток OpTmizer™ CTS™ (Thermofier).

[0560] В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда содержит питательную смесь неорганических солей, сахаров, аминокислот и, необязательно, витамины, органические кислоты, антиоксиданты и/или буферы.

[0561] В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда содержит CO_3 и HCO_3. В некоторых вариантах осуществления содержание CO_3 и HCO_3 в базальной среде уравновешивают газообразным CO_2 (например, 5-10% CO_2), поддерживая таким образом оптимальное значение pH среды. В некоторых вариантах осуществления базальная среда содержит цвиттерион, HEPES. В некоторых вариантах базальная среда содержит феноловый красный. В некоторых вариантах базальная среда не содержит фенолового красного.

[0562] В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда содержит неорганическую соль. В некоторых вариантах осуществления изобретения неорганическая соль способствует осмотическому балансу. В некоторых вариантах осуществления изобретения неорганическая соль регулирует потенциал мембраны путем обеспечения ионов натрия, калия и кальция.

[0563] В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда содержит один или несколько углеводов. В некоторых вариантах осуществления углевод представляет собой глюкозу. В некоторых вариантах осуществления изобретения углевод представляет собой галактозу. В некоторых вариантах осуществления углевод представляет собой мальтозу. В некоторых вариантах осуществления углевод представляет собой фруктозу.

[0564] В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда содержит жирную кислоту. В некоторых вариантах осуществления базальная среда содержит липид. В некоторых вариантах осуществления базальная среда содержит витамин (например, витамин A, витамин B7, витамин B9, витамин B12, витамин C, витамин E). В некоторых вариантах осуществления базальная среда содержит микроэлементы. В некоторых вариантах осуществления микроэлементы содержит медь. В некоторых вариантах осуществления микроэлементы содержит цинк. В некоторых вариантах осуществления микроэлементы содержат селен. В некоторых вариантах осуществления микроэлементы содержат промежуточное соединение трикарбоновой кислоты.

[0565] В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда содержит смесь неорганических солей, сахаров, аминокислот и, необязательно, витаминов, органических кислот и/или буферов, или других хорошо известных питательных веществ для культивирования клеток. В дополнение к питательным веществам среда также обеспечивает поддержание pH и осмоляльности. В некоторых

аспектах реагенты базальной среды поддерживают рост клеток, пролиферацию и/или размножение. Разнообразные коммерчески доступные базальные среды хорошо известны специалистам в данной области, и эти среды включают модифицированную по Дульбекко среду Игла (DMEM), среду Дульбекко (RPMI), модифицированную среду Дульбекко и среду Хэма. В некоторых вариантах осуществления базальная среда представляет собой модифицированную среду Дульбекко, RPMI 1640 или альфа-MEM

[0566] В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда не содержит белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда не содержит белка человека (например, сывороточного белка человека). В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда не содержит сыворотки. В некоторых вариантах осуществления базальная среда не содержит сыворотки, полученной от человека. В некоторых вариантах осуществления базальная среда свободна от рекомбинантного белка. В некоторых вариантах осуществления базальная среда не содержит белка человека и рекомбинантного белка.

[0567] В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда содержит белок или пептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок представляет собой альбумин или заменитель альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения альбумин представляет собой альбумин, полученный от человека. В некоторых вариантах осуществления альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин. В некоторых вариантах осуществления альбумин представляет собой природный сывороточный альбумин человека. В некоторых вариантах осуществления альбумин является рекомбинантным сывороточным альбумином человека. В некоторых вариантах осуществления альбумин является рекомбинантным альбумином из источника, не являющегося человеком. Заменители альбумина могут представлять собой любой источник белка или полипептида. Примеры таких белковых или полипептидных образцов включают, без ограничения, экстракт бычьего гипофиза, гидролизат растений (например, гидролизат риса), фетальный сывороточный альбумин (фетуин), яичный альбумин, сывороточный альбумин человека (HSA) или другие альбумины полученные от животного, экстракт нута, экстракт эмбриона крупного рогатого скота, AlbuMAX® I и AlbuMAX® II. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок или пептид содержит трансферрин. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок или пептид включает фибронектин. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок или пептид включает апротинин. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок включает фетуин.

[0568] В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда (например, базальная среда) представляет собой жидкость. В некоторых вариантах осуществления изобретения базальная среда (например, базальная среда) не была заморожена или не должна быть заморожена (например, в соответствии с протоколом ее использования) перед предполагаемым использованием. В некоторых вариантах осуществления базальную среду хранят при температуре 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 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель при хранении ее при температуре от 2°C до 8°C. В некоторых вариантах осуществления базальная среда стабильна в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев при хранении ее при температуре от 2°C до 8°C.

B. Добавка

[0569] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается добавка, такая как первая добавка, содержащая свободную форму глутамина (то есть L-глутамина). В некоторых вариантах осуществления такую добавку замораживают перед использованием и/или включением в базальную среду. В некоторых вариантах осуществления добавка, такая как описанные здесь добавки, предназначена для использования в качестве добавки к среде (например, добавки для базальной среды). В некоторых вариантах осуществления первая добавка предназначена для использования в качестве добавки для поддержания, размножения и/или активации клетки. В некоторых вариантах осуществления первая добавка предназначена для использования в качестве добавки для размножения клетки. В некоторых вариантах осуществления первая добавка включает замороженную добавку, содержащую по меньшей мере один белок и свободную форму глутамина (т.е. L-глутамина), где базальная среда для культивирования клеток, дополненная первой добавкой, способна поддерживать размножение клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка является первичной клеткой. В некоторых вариантах осуществления изобретения клеткой является иммунная клетка. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах выполнения клетка представляет собой CD4 Т-клетку или CD8 Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка является иммунной клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой Т-клетку человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения клеткой является первичная иммунная клетка человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой генетически сконструированную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой генетически сконструированную клетку, полученную от человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой генетически сконструированную Т-клетку (например, Т-клетку, экспрессирующую химерный рецептор антигена (CAR)) человека.

[0570] В некоторых вариантах осуществления первую добавку хранят или ее рекомендуется хранить при температуре равной или приблизительно равной от -20°C до 0°C перед ее предполагаемым использованием. В некоторых вариантах осуществления добавку хранят или ее рекомендуется хранить при температуре менее чем приблизительно 0°C. В некоторых вариантах осуществления добавку замораживают немедленно или сразу после того, как свободная форма глутамина (то есть L-глутамина) включена в нее в

качестве компонента. В некоторых вариантах осуществления добавку замораживают после добавки глутамина (то есть L-глутамина) и она находится в замороженном состоянии до момента, когда добавку используют для намеченного применения. В некоторых вариантах осуществления добавка не является жидкостью в течение более 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после введения в нее свободной формы глутамина (то есть L-глутамина) в качестве ее компонента, и до тех пор, пока добавка не будет использована для целевого назначения. В некоторых вариантах осуществления добавку не хранят в виде жидкости в течение более или приблизительно 4, 8, 12, 16, 20 или 24 часов после добавления в нее свободной формы глутамина (то есть L-глутамина) в качестве ее компонента, и до тех пор, пока добавка не будет использована для целевого назначения. В некоторых вариантах осуществления добавка находится в замороженном состоянии в течение большей части времени от момента добавки свободной формы глутамина (то есть L-глутамина) в качестве ее компонента, и до тех пор, пока добавка не будет использована для целевого назначения. В некоторых вариантах осуществления добавка находится при комнатной температуре или при более низкой (например, добавка находится при температуре ниже или приблизительно ниже 20°C, 15°C, 10°C, 5°C или 0°C) после добавления в нее свободной формы глутамина (то есть L-глутамина) в качестве ее компонента.

[0571] В некоторых вариантах осуществления L-глутамин не осаждается при оттаивании добавки. В некоторых вариантах осуществления L-глутамин не осаждается, когда добавка является жидкостью. В некоторых вариантах осуществления L-глутамин в добавке не осаждается при оттаивании добавки при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрация L-глутамина в добавке равна, или меньше, или приблизительно равна, или приблизительно меньше 200 мМ, 180 мМ, 160 мМ, 140 мМ, 120 мМ, 100 мМ или 80 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в добавке находится в диапазоне, составляющем от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 30 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно 50 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 70 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 90 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 110 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 130 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 150 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 170 мМ от или приблизительно от 30 мМ до или приблизительно до 50 мМ, от или приблизительно от 30 мМ до или приблизительно до 70 мМ, от или приблизительно от 30 мМ до или приблизительно до 110 мМ, от или приблизительно от 30 мМ до или приблизительно до 130 мМ, от или приблизительно от 30 мМ до или приблизительно до 150 мМ, от или приблизительно от 30 мМ до или приблизительно до 170 мМ, от или приблизительно от 50 мМ до или приблизительно до 70 мМ, от или приблизительно от 50 мМ до или приблизительно до 90 мМ, от или приблизительно от 50 мМ до или приблизительно до 110 мМ, от или приблизительно от 50 мМ до или

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

[0572] В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (то есть L-глутамина) в добавке такова, что после объединения добавки с базальной средой (такой как описанная здесь) концентрация свободной формы глутамина (то есть L-глутамина) в среде находится в диапазоне равном или приблизительно равном 0,5 мМ-5 мМ. в некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (то есть L-глутамина) в базальной среде равна или приблизительно равна 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (то есть L-глутамина) равна или приблизительно равна 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, 125 мМ - 3 мМ, 125 мМ - 3,5 мМ, 1-5 мМ - 4 мМ, 125 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, включая указанные граничные значения. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (то есть L-глутамин) в базальной среде равна или приблизительно равна или приблизительно равна 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 - 10,5 мМ, 7,5 мМ - 12,5 мМ, 7,5 мМ - 15,5 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, включая указанные граничные значения. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (то есть L-глутамина) 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 глутамина (то есть L-глутамина) в базальной среде составляет не более или приблизительно не более 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, 1 мМ, 5 мМ, 1 мМ, 1 мМ, 5 мМ или 20 мМ.

[0573] В некоторых вариантах осуществления изобретения первая добавка содержит один или несколько дополнительных компонентов. В некоторых вариантах осуществления дополнительная добавка, такая как вторая добавка, предназначена для обеспечения одного или нескольких дополнительных компонентов. В некоторых вариантах осуществления изобретения добавки, первую добавку и, необязательно, одну или несколько дополнительных добавок, например вторую добавку, объединяют с базальными средами для обеспечения одного или нескольких дополнительных компонентов в базальной среде.

[0574] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько дополнительных компонентов включают по меньшей мере один белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один белок не является белком млекопитающено. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является белком человека или производным от белка 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 изобретения белок включает одно или несколько из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно одно или несколько из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

[0575] В некоторых вариантах осуществления изобретения белок представляет собой альбумин или заменитель альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения альбумин представляет собой альбумин, полученный от человека. В некоторых вариантах осуществления альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин. В некоторых вариантах осуществления альбумин представляет собой природный сывороточный альбумин человека. В некоторых вариантах осуществления альбумин является рекомбинантным сывороточным альбумином человека. В некоторых вариантах осуществления альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин, полученный из источника, не являющимся человеком. Заменители альбумина могут представлять собой любой источник белка или полипептида. Примеры таких белковых или полипептидных образцов включают, без ограничения, экстракт бычьего гипофиза, гидролизат из растений (например, гидролизат риса), фетальный сывороточный альбумин (фетуин), яичный альбумин, сывороточный альбумин человека (HSA) или другие альбумины полученные от животных, экстракт нута, экстракт бычьего эмбриона, AlbuMAX® I и AlbuMAX® II.

[0576] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько дополнительных компонентов включают альбумин. В некоторых вариантах осуществления изобретения альбумин представляет собой альбумин человека или производное альбумина человека. В некоторых вариантах осуществления альбумин получают из сыворотки человека или плазмы человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения альбумин является рекомбинантным альбумином. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный альбумин происходит от альбумина человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный альбумин получают из источника, не являющегося человеком. В некоторых вариантах осуществления добавка содержит природный альбумин. В некоторых вариантах осуществления изобретения природный альбумин получен от человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения природный альбумин не получен от человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация альбумина в добавке такова, что после объединения добавки с базальной средой (такой как описанная здесь) концентрации альбумина в среде составляет от или приблизительно от 0 мг/мл до или приблизительно до 2 мг/мл, от или приблизительно от 0 мг/мл до или приблизительно до 4 мг/мл, от или приблизительно от 0 мг/мл до приблизительно или приблизительно до 6 мг/мл, от или приблизительно от 0 мг/мл до или приблизительно до 8 мг/мл, от или приблизительно от 0 мг/мл до или приблизительно до 10 мг/мл, от или приблизительно от 0 мг/мл до или приблизительно до 12 мг/мл, от или приблизительно от 2 мг/мл до или приблизительно до 4 мг/мл, от или приблизительно от 2 мг/мл до или приблизительно до 6 мг/мл, от или приблизительно от 2 мг/мл до или приблизительно до 8 мг/мл, от или приблизительно от 2 мг/мл до или приблизительно до 10 мг/мл, от или приблизительно от 2 мг/мл до или приблизительно до 12 мг/мл, от или приблизительно от 4 мг/мл до или приблизительно до 6 мг/мл, от или приблизительно от 4 мг/мл до или приблизительно до 8 мг/мл, от или приблизительно от 4 мг/мл до или приблизительно до 10 мг/мл, от или приблизительно от 4 мг/мл до или приблизительно 12 мг/мл, от или приблизительно от 6 мг/мл до или приблизительно до 8 мг/мл, от или приблизительно от 6 мг/мл до или приблизительно до 10 мг/мл, от или приблизительно от 6 мг/мл до или приблизительно до 12 мг/мл, от или приблизительно от 8 мг/мл до или приблизительно до 10 мг/мл, от или приблизительно от 8 мг/мл до приблизительно 12 мг/мл, от или приблизительно от 10 мг/мл до или приблизительно до 12 мг/мл или от или приблизительно от 10 мг/мл до или приблизительно до 15 мг/мл, включая граничные значения. В некоторых вариантах осуществления, содержание альбумина в среде составляет 5 мг/мл или приблизительно 5 мг/мл.

[0577] В некоторых вариантах осуществления один или несколько дополнительных компонентов включают трансферрин или заменитель трансферрина. В некоторых вариантах осуществления заменитель трансферрина представляет собой соединение, которое может заменить трансферрин в добавке, чтобы получить по существу аналогичные результаты, как и в случае использования трансферрина. Примеры

заменителей трансферрина включают, без ограничения, любое хелатное соединение железа. Хелатные соединения железа, которые могут быть использованы, включают, без ограничения, хелаты железа с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA), этиленгликоль-бис(бета-аминоэтиловый эфир)-N, N,N',N'-тетрауксусной кислотой (EGTA), мезилатом дефероксамина, димеркаптопропанолом, диэтилентриаминпентауксусной кислотой (DPT A) и транс-1,2-диаминоциклогексан-N, N,N',N'-тетрауксусной кислотой (CDTA), а также хелат цитрата железа и хелат сульфата железа. В некоторых вариантах осуществления трансферрин представляет собой насыщенный железом трансферрин. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансферрин представляет собой насыщенный железом трансферрин человека.

[0578] В некоторых вариантах осуществления изобретения трансферрин или заменитель трансферрина представляет собой трансферрин человека или трансферрин, полученный от человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансферрин или заменитель трансферрина получают из сыворотки или плазмы человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансферрин или заменитель трансферрина представляет собой рекомбинантный трансферрин. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация трансферрина такова, что после объединения добавки с базальной средой (такой как описанная здесь), концентрация трансферрина в среде составит от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно 50 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 100 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 150 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 200 мг./Л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л. от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от приблизительно 10 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от приблизительно 10 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от приблизительно 50 мг/л до или приблизительно до 100 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 150 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 200 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или до приблизительно 400 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от приблизительно 50 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от

100 мг/л до или приблизительно до 150 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 200 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 200 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от приблизительно 250 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от приблизительно 300 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от приблизительно 300 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от приблизительно 300 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от

350 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 6 50 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, при или от приблизительно 500 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 550 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 550 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 550 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 550 мг/л, до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 600 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 600 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л или от или приблизительно от 650 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л. В некоторых вариантах осуществления концентрация трансферрина такова, что после объединения добавки с базальной средой (такой как описанная здесь), концентрация трансферрина в среде будет равна или приблизительно равна 100 мг/л. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация трансферрина такова, что после объединения добавки с базальной средой (такой как описанная здесь), концентрация трансферрина в среде концентрация трансферрина в среде составит от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 150 мг/л.

[0579] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько дополнительных компонентов включают инсулин или заменитель инсулина. В некоторых вариантах осуществления заменитель инсулина представляет собой цинксодержащее соединение, которое может быть использовано вместо инсулина для получения по существу аналогичных результатов, как при использовании инсулина. Примеры заменителей инсулина включают, без ограничения, хлорид цинка, нитрат цинка, бромид цинка и сульфат цинка. Ряд инсулинов известен специалистам в данной области техники. См. Gilman, AG et al. Eds., the Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon Press, New

York, 1990, pp. 1463-1495. В некоторых вариантах осуществления изобретения в качестве добавки к среде используют инсулин, а не заменитель инсулина. В некоторых вариантах осуществления инсулин представляет собой цинк-инсулин. В некоторых вариантах осуществления инсулин представляет собой цинк-инсулин человека.

[0580] В некоторых вариантах осуществления изобретения инсулин является инсулином человека или производным инсулина человека. В некоторых вариантах осуществления инсулин представляет собой рекомбинантный инсулин. В некоторых вариантах выполнения инсулин является рекомбинантным инсулином человека. В некоторых вариантах выполнения концентрация инсулина (или заменителя инсулина) такова, что после объединения добавки с базальной средой (такой как описанная здесь), концентрации инсулина (или заменителя инсулина)) в среде составляет от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 2,5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 7,5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 10 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 12,5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 15 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 17,5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 22,5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 25 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 27,5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 5 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 7,5 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 10 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 12,5 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 15 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 17,5 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 22,5 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 25 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 27,5 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 7,5 мг/л, от приблизительно 5 мг/л до или приблизительно до 10 мг/л, от приблизительно 5 мг/л до или приблизительно до 12,5 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 15 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 17,5 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 22,5 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 25 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 27,5 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 7,5 мг/л до или приблизительно до 10 мг/л, от или приблизительно от 7,5 мг/л до или приблизительно до 12,5 мг/л, от или приблизительно от 7,5 мг/л. до или приблизительно до 15 мг/л, от или приблизительно от 7,5 мг/л до

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

[0581] В некоторых вариантах осуществления добавку, например первую добавку, получают добавлением или смешиванием L-глутамина с существующими добавками, содержащими один или несколько желательных компонентов. В некоторых вариантах

осуществления L-глутамин добавляют или смешивают с добавкой для замены сыворотки, например, с заменителем сыворотки для иммунных клеток Immune Cell Serum Replacement (ThermoFisher, #A2598101). В некоторых вариантах осуществления изобретения L-глутамин добавляют или смешивают с добавкой, которая включает заменитель сыворотки для иммунных клеток, описаный в Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в добавке составляет от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 30 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 50 мМ, от приблизительно 10 мМ до или приблизительно до 70 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 90 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 110 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 130 мМ, от или от приблизительно 10 мМ до или приблизительно до 150 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно 170 мМ, от или приблизительно 30 мМ до приблизительно или приблизительно 50 мМ, от приблизительно 30 мМ до приблизительно 70 мМ, от приблизительно 30 мМ до приблизительно или 90 мМ, от или приблизительно до 30 мМ до или приблизительно до 110 мМ, или приблизительно 30 мМ до или приблизительно 130 мМ, или приблизительно 30 мМ до или приблизительно 150 мМ, или приблизительно 30 мМ до или приблизительно 170 мМ, от или приблизительно от 50 мМ до или приблизительно до 70 мМ, от или приблизительно от 50 мМ до или приблизительно до 90 мМ, от или приблизительно от 50 мМ до или приблизительно до 110 мМ, от или приблизительно от 50 мМ до или приблизительно до 130 мМ, от или приблизительно от 50 мМ до от или приблизительно от 150 мМ, от или приблизительно от 50 мМ до или приблизительно до 170 мМ, от или приблизительно от 70 мМ до или приблизительно до 90 мМ, от или приблизительно от 70 мМ до или приблизительно до 110 мМ, от или приблизительно от 70 мМ до или приблизительно до 130 мМ, от или приблизительно от 70 мМ до или приблизительно до 150 мМ, от или приблизительно от 70 мМ до или приблизительно до 170 мМ, от или приблизительно от 90 мМ до или приблизительно до 110 мМ, от или приблизительно от 90 мМ до или приблизительно до 130 мМ, от или приблизительно от 90 мМ до или приблизительно до 150 мМ, от или приблизительно от 90 мМ до или приблизительно до 170 мМ, от или приблизительно от 110 мМ до или приблизительно до 130 мМ, от или приблизительно от 110 мМ до или приблизительно до 150 мМ, от или приблизительно от 110 мМ до или приблизительно до 170 мМ, от или приблизительно от 130 мМ до или приблизительно до 150 мМ, от или приблизительно от 130 мМ до или приблизительно до 170 мМ, или приблизительно или приблизительно 150 мМ до или приблизительно до 170 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глутамина в добавке равна или приблизительно равна80 мМ.

[0582] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько дополнительных компонентов включают 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 инсулинподобный фактор роста (IGF). В некоторых вариантах осуществления изобретения фактор роста включает фактор роста нервов (NGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста включает тромбоцитарный фактор роста (PDGF). В некоторых вариантах осуществления фактор роста включает трансформирующий фактор роста (TGF)

[0583] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько дополнительных компонентов включают гормон (например, гормон роста, инсулин, гидрокортизон, трийодтиронин, эстроген, андроген, прогестерон, пролактин, фолликулостимулирующий гормон, гастрин-высвобождающий пептид). В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько дополнительных компонентов включают альфа-глобулин или бета-глобулин. В некоторых вариантах осуществления один или несколько дополнительных компонентов включают пептид или пептидную фракцию (например, белковый гидролизат, полученный из животного, микроорганизма или растения).

[0584] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько дополнительных компонентов включают липид. В некоторых вариантах осуществления изобретения 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 липид включает холин. В некоторых вариантах осуществления липид включает инозит.

[0585] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько 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 йод. В некоторых вариантах переходный металл включает кобальт. В некоторых вариантах переходный металл включает селен. В некоторых вариантах переходный металл включает магний. В некоторых вариантах осуществления переходный металл включает молибден.

[0586] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько дополнительных компонентов включают витамин. В некоторых вариантах осуществления изобретения витамин включает жирорастворимый витамин (например, витамин A, витамин D, витамин E, витамин K) и витамин e (a). В некоторых вариантах осуществления витамин включает водорастворимый витамин (например, B1, B2, B6, B12, C, фолат).

[0587] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько 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.

[0588] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько 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.

[0589] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько 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 изобретения защитная добавка включает твин 80.

[0590] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько дополнительных компонентов включают фактор адгезии. В некоторых вариантах осуществления фактор адгезии включает фибронектин. В некоторых вариантах осуществления фактор адгезии включает ламинин.

[0591] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько дополнительных компонентов представляют собой один или несколько из одного или нескольких антиоксидантов, одного или нескольких альбуминов или заменителей альбумина, одного или нескольких липидных агентов, одного или нескольких инсулинов или заменителей инсулина, одного или нескольких трансферринов или заменителей трансферрина, одного или нескольких микроэлементов и одного или нескольких 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 представляет собой сывороточный альбумин человека. В некоторых вариантах осуществления липидные агенты включают Human Ex-Cite® или этаноламин или их производные и их смеси. В некоторых вариантах осуществления инсулин представляет собой цинк-инсулин человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансферрин является, насыщенным железом трансферрин человека. В некоторых вариантах осуществления микроэлемент представляет собой Se^{4+}. В некоторых вариантах осуществления глюкокортикоид представляет собой гидрокортизон. В некоторых вариантах осуществления добавка является концентрированной.

[0592] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько дополнительных компонентов включают один или несколько антиоксидантов и один или несколько ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из одного или нескольких альбуминов или заменителей альбумина, одного или нескольких липидных агентов, одного или нескольких инсулинов или заменителей инсулина, одного или нескольких трансферринов или заменителей трансферрина, одного или нескольких микроэлементов и одного или нескольких глюкокортикоидов.

[0593] В некоторых вариантах осуществления один или несколько дополнительных компонентов включают один или несколько из N-ацетил-L-цистеина, сывороточного альбумина человека, Human Ex-Cyte®, этаноламина, цинк-инсулина человека, насыщенного железом трансферрина человека, Se^{4+}, гидрокортизона, ацетата D, L-токоферола и/или 2-меркаптоэтанола.

[0594] В некоторых вариантах осуществления один или несколько 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 описанной здесь), концентрация NAC в базальной среде составляет от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 50 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 100 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 150 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 200 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 700 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 100 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 150 мг/л, т или приблизительно 50 мг/л до или приблизительно до 200 мг/л, приблизительно или приблизительно 50 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до приблизительно 450 мг/л, от приблизительно 50 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от приблизительно 50 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от приблизительно 50 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от приблизительно 50 мг/л до или приблизительно до 700 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 150 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 200 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 6 50 мг/л, от или приблизительно

от 100 мг/л до или приблизительно до 700 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до от или приблизительно от 200 мг/л, до или приблизительно до 150 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от приблизительно 150 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от приблизительно 150 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от приблизительно 150 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 700 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 700 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от приблизительно 250 мг/л до приблизительно 650 мг/л, от приблизительно 250 мг/л до приблизительно 700 мг/л, от приблизительно 300 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или от приблизительно 300 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л л до или приблизительно до 700 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 700 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или

приблизительно до 650 мг/л, от приблизительно или приблизительно 400 мг/л до или приблизительно до 700 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 700 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 700 мг/л, от или приблизительно от 550 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 550 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 550 мг/л до или приблизительно до 70 0 мг/л, от или приблизительно от 600 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 60 мг/л до или приблизительно до 700 мг/л или от или приблизительно от 650 мг/л до или приблизительно до 700 мг/л.

[0595] В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация NAC в базальной среде составляет от или приблизительно от 0 мМ до или приблизительно до 1 мМ, от или приблизительно от 0 мМ до или приблизительно до 2 мМ, от или приблизительно от 0 мМ до или приблизительно до 3 мМ, от или приблизительно от 0 мМ до или приблизительно до 4 мМ, от или приблизительно от 0 мМ до или приблизительно до 5 мМ, от или приблизительно от 0 мМ до или приблизительно до 6 мМ, от или приблизительно от 0 мМ до или приблизительно до 7 мМ, от или приблизительно от 0 до или приблизительно до 8 мМ, от или приблизительно от 0 до или приблизительно до 9 мМ, от или приблизительно от 0 до приблизительно 10 мМ, от или приблизительно от 0 до или приблизительно до 12 мМ, от или приблизительно от 0 мМ до или приблизительно до 14 мМ, от или приблизительно от 0 мМ до или приблизительно до 16 мМ, от или приблизительно от 0 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 0 мМ до или приблизительно до 20 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 2 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 3 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 4 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 5 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 6 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 7 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 8 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 9 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 10 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 12 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 14 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 16 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 1 мМ до или приблизительно до 20 мМ, от или приблизительно от 2 мМ до или приблизительно до 3 мМ, от или приблизительно от 2 мМ до или приблизительно до 4 мМ, от или приблизительно от 2 мМ до или приблизительно до 5 мМ, от или приблизительно от 2 мМ

до или приблизительно до 6 мМ, от или приблизительно от 2 мМ до или приблизительно до 7 мМ, от или приблизительно от 2 мМ до или приблизительно до 8 мМ, от или приблизительно от 2 мМ до или приблизительно до 9 мМ, от или приблизительно от 2 мМ до или приблизительно до 10 мМ, от или приблизительно от 2 мМ до или приблизительно до 12 мМ, от или приблизительно от 2 мМ до или приблизительно до 14 мМ, от или приблизительно от 2 мМ до или приблизительно до 16 мМ, от или приблизительно от 2 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 2 мМ до или приблизительно до 20 мМ, от или приблизительно от 3 мМ, до или приблизительно до 4 мМ, от или приблизительно от 3 мМ до или приблизительно до 5 мМ, от или приблизительно от 3 мМ до или приблизительно до 6 мМ, от или приблизительно от 3 мМ до или приблизительно до 7 мМ, от или приблизительно от 3 мМ до или приблизительно до 8 мМ, от или приблизительно от 3 мМ до или приблизительно до 9 мМ, от или приблизительно от 3 мМ до или приблизительно до 10 мМ, от или приблизительно от 3 мМ до или приблизительно до 12 мМ, от или приблизительно от 3 мМ до или приблизительно до 14 мМ, от или приблизительно от 3 мМ до или приблизительно до 16 мМ, от или приблизительно от 3 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 3 мМ до или приблизительно до 20 мМ, от или приблизительно от 4 до приблизительно 5 мМ, от или приблизительно от 4 до или приблизительно до 6 мМ, от или приблизительно от 4 до или приблизительно 7 мМ, от или приблизительно от 4 до или приблизительно до 8 мМ, от или приблизительно от 4 до или приблизительно до 9 мМ, от или приблизительно от 4 до или приблизительно до 10 мМ, от или приблизительно от 4 до или приблизительно до 12 мМ, от или приблизительно от 4 до или приблизительно до 14 мМ, от или приблизительно от 4 мМ до или приблизительно до 16 мМ, от или приблизительно от 4 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 4 мМ до или приблизительно до 20 мМ, от или приблизительно от 5 мМ до или приблизительно до 6 мМ, от или приблизительно от 5 мМ до или приблизительно до 7 мМ, от или приблизительно от 5 мМ до или приблизительно до 8 мМ, от или приблизительно от 5 мМ до или приблизительно до 9 мМ, от или приблизительно от 5 мМ до или приблизительно до 10 мМ, от или приблизительно от 5 мМ до или приблизительно до 12 мМ, от или приблизительно от 5 мМ до или приблизительно до 14 мМ, от или приблизительно от 5 мМ до или приблизительно до 16 мМ, от или приблизительно от 5 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 5 мМ до или приблизительно до 20 мМ, от или приблизительно от 6 мМ до или приблизительно до 7 мМ, от или приблизительно от 6 мМ до или приблизительно до 8 мМ, от или приблизительно от 6 мМ до или приблизительно до 9 мМ, от или приблизительно от 6 мМ до или приблизительно до 10 мМ, от или приблизительно от 6 мМ до или приблизительно до 12 мМ, от или приблизительно от 6 мМ до или приблизительно до 14 мМ, от или приблизительно от 6 мМ до или приблизительно до 16 мМ, от или приблизительно от 6 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 6 мМ до или приблизительно до 20 мМ, от или приблизительно от 7 мМ до или приблизительно до 8

мМ, от или приблизительно от 7 мМ до или приблизительно до 9 мМ, от или приблизительно от 7 мМ до или приблизительно до 10 мМ, от или приблизительно от 7 мМ до или приблизительно до 12 мМ, от или приблизительно от 7 мМ до или приблизительно до 14 мМ, от или приблизительно от 7 мМ до или приблизительно до 16 мМ, от приблизительно 7 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 7 мМ до или приблизительно до 20 мМ, от или приблизительно от 8 мМ до или приблизительно до 9 мМ, от или приблизительно от 8 мМ до или приблизительно до 10 мМ, от или приблизительно от 8 мМ до или приблизительно до 12 мМ, от или приблизительно от 8 мМ до или приблизительно до 14 мМ, от или приблизительно от 8 мМ до или приблизительно до 16 мМ, от или приблизительно от 8 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 8 мМ до или приблизительно до 20 мМ, от или приблизительно от 9 мМ до или приблизительно до 10 мМ, от или приблизительно от 9 мМ до или приблизительно до 12 мМ, от или приблизительно от 9 мМ до от или приблизительно от 14 мМ, от или приблизительно от 9 мМ до или приблизительно до 16 мМ, от или приблизительно от 9 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 9 мМ до или приблизительно до 20 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или от приблизительно 12 мМ, до или приблизительно до 10 мМ до или приблизительно до 14 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 16 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 10 мМ до или приблизительно до 20 мМ мМ, от или приблизительно от 12 мМ до или приблизительно до 14 мМ, от или приблизительно от 12 мМ до или приблизительно до 16 мМ, от или приблизительно от 12 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 12 мМ до или приблизительно до 20 мМ, от или приблизительно от 14 мМ до или приблизительно до 16 мМ, от или приблизительно от 14 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 14 мМ до или приблизительно до 20 мМ, от или приблизительно от 16 мМ до или приблизительно до 18 мМ, от или приблизительно от 16 мМ до или приблизительно 20 мМ, от или приблизительно от 18 мМ до или приблизительно до 20 мМ.

[0596] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько дополнительных компонентов включают этаноламин. В некоторых вариантах осуществления концентрация этаноламина такова, что после объединения добавки с базальной средой (такой как описанная здесь) концентрация этаноламин в базальной среде составит от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 2 мг/л, от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 4 мг/л, от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 6 мг/л, от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 8 мг/л, от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 10 мг/л, от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 12 мг/л от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 14 мг/л от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 16 мг/л, от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 18 мг/л, от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 20

мг/л, от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 22 мг/л, от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 24 мг/л, от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, до или приблизительно до 0 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, от или приблизительно от 0 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 4 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 6 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 8 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 10 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 12 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 14 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 16 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 18 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 22 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 24 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, от или приблизительно от 2 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 4 мг/л до или приблизительно до 6 мг/л, от или приблизительно от 4 мг/л до или приблизительно до 8 мг/л, от или приблизительно от 4 мг/л до или приблизительно до 10 мг/л, от или приблизительно от 4 мг/л до или приблизительно до 12 мг/л, от или приблизительно от 4 мг/л до или приблизительно до 14 мг/л, от или приблизительно от 4 мг/л до или приблизительно до 16 мг/л, от или приблизительно от 4 мг/л до или приблизительно до 18 мг/л, от или приблизительно от 4 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 4 мг/л до или приблизительно до 22 мг/л, от или приблизительно от 4 мг/л до или приблизительно до 24 мг/л, от или приблизительно от 4 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, от или приблизительно от 4 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, приблизительно или приблизительно 4 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 6 мг/л до или приблизительно до 8 мг/л, от или приблизительно от 6 мг/л до или приблизительно до 10 мг/л, от или приблизительно от 6 мг/л до или приблизительно до 12 мг/л, от или приблизительно от 6 мг/л до или приблизительно до 14 мг/л, от или приблизительно от 6 мг/л до или приблизительно до 16 мг/л, от или приблизительно от 6 мг/л до или приблизительно до 18 мг/л, от или приблизительно от 6 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 6 мг/л до или приблизительно до 22 мг/л, от или приблизительно от 6 мг/л до или приблизительно до 24 мг/л, от или приблизительно от 6 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, от или приблизительно от 6 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, от или приблизительно от 6 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 10 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 12 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 14 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 16 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 18 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или

приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 22 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 24 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, приблизительно или приблизительно 8 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 12 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 14 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 16 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 18 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 22 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 24 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, от или приблизительно от 8 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 12 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 14 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 16 мг/л, приблизительно или приблизительно 10 мг/л до или приблизительно до 18 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до у или от или приблизительно от 22 мг/л, до или приблизительно до 10 мг/л до или приблизительно до 24 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 12 мг/л до или приблизительно до 14 мг/л, от или приблизительно от 12 мг/л до или приблизительно до 16 мг/л, от или приблизительно от 12 мг/л до или приблизительно до 18 мг/л, от или приблизительно от 12 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 12 мг/л до или приблизительно до 2,2 мг/л, от или приблизительно от 12 мг/л до или приблизительно до 24 мг/л, от или приблизительно от 12 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, от или приблизительно от 12 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, от или приблизительно от 12 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 14 мг/л до или приблизительно до 16 мг/л, от или приблизительно от 14 мг/л до или приблизительно до 18 мг/л, от или приблизительно от 14 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 14 мг/л до или приблизительно до 22 мг/л, от или приблизительно от 14 мг/л до или приблизительно до 24 мг/л, от или приблизительно от 14 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, от или приблизительно от 14 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, от или приблизительно от 14 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 16 мг/л до или приблизительно до 18 мг/л, от или приблизительно от 16 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 16 мг/л до или приблизительно до 22 мг/л, от или приблизительно от 16 мг/л до или приблизительно до 24 мг/л, от или приблизительно от 16 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, от или приблизительно от 16 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, от или приблизительно от 16 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от

18 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 18 мг/л до или приблизительно до 22 мг/л, от или приблизительно от 18 мг/л до или приблизительно до 24 мг/л, от или приблизительно от 18 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, от или приблизительно от 18 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, от или приблизительно от 18 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 20 мг/л до или приблизительно до 22 мг/л, от или приблизительно от 20 мг/л до или приблизительно до 24 мг/л, от или приблизительно от 20 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, от или приблизительно от 20 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, от или приблизительно от 20 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 22 мг/л до или приблизительно до 24 мг/л, от или приблизительно от 22 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, от или приблизительно от 22 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, от или приблизительно от 22 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 24 мг/л до или приблизительно до 26 мг/л, от или приблизительно от 24 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, от или приблизительно от 24 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 26 мг/л до или приблизительно до 28 мг/л, от или приблизительно от 26 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, или от или приблизительно от 28 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л.

[0597] В некоторых вариантах осуществления изобретения добавка является жидкой. В некоторых вариантах осуществления добавка не замораживается или ее не рекомендуются замораживать для хранения. В некоторых вариантах осуществления добавка содержит альбумин, N-ацетил-L-цистеин (NAC) и этаноламин. В некоторых вариантах осуществления добавка содержит альбумин, N-ацетил-L-цистеин (NAC) и этаноламин, где концентрация альбумина, NAC и/или этаноламина такова, что после объединения добавки с базальной средой (такой как описанная здесь) концентрация альбумина, NAC и/или этаноламина является, по существу, такой же, как описано здесь. В некоторых вариантах осуществления альбумин представляет собой альбумин, полученный от человека. В некоторых вариантах альбумин представляет собой альбумин человека, полученный из плазмы человека или сыворотки. В некоторых вариантах осуществления добавка представляет собой жидкость и не содержит или не включает значительного количества свободной формы глутамина (то есть L-глутамина).

[0598] В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительную добавку, например вторую добавку, объединяют с базальными средами для получения одного или нескольких дополнительных компонентов. В некоторых вариантах осуществления дополнительная добавка, например вторая добавка, представляет собой добавку для размножения клеток. В некоторых вариантах осуществления дополнительная добавка, например вторая добавка, представляет собой или содержит добавку OpTmizer® (Thermofisher, часть A1048503).

[0599] В некоторых вариантах осуществления изобретения добавку концентрируют в 2 или приблизительно в 2 раза и до или приблизительно в 100 раз. В некоторых вариантах осуществления добавка находится в виде препарата 40X или приблизительно

40X. В некоторых вариантах осуществления на литр базальной среды добавляют по меньшей мере от 20 до 30 миллилитров, например, 25 ± 2 миллилитра по меньшей мере одной добавки, включая первую добавку и, в некоторых случаях, одну или несколько дополнительных добавок.

C. Бессывороточные среды

[0600] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда содержит синтетическую аминокислоту (например, дипептидную форму L-глутамина, например L-аланил-L-глутамин), свободную форму глутамина (то есть L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота (например, дипептидная форма L-глутамина, например L-аланил-L-глутамин) способна превращаться в свободную форму глутамина (то есть L-глутамина) в клеточной культуре, содержащей клетку, где среда не содержит сыворотки. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка включает человеческую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка включает иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой генетически сконструированную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой генетически сконструированную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетку генетически конструируют для экспрессии рекомбинантного рецептора (например, химерного рецептора антигена). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой Т-клетки, экспрессирующие химерный рецептор антигена (CAR).

[0601] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда, дополнительно содержит по меньшей мере один белок. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит синтетическую аминокислоту, где синтетическая аминокислота (например, дипептидная форма L-глутамина, например L-аланил-L-глутамин) способна превращаться в свободную форму глутамина (то есть L-глутамин) в клеточной культуре, содержащей клетку, и по меньшей мере один белок, где среда не содержит сыворотки.

[0602] В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота представляет собой стабилизированную форму глутамина (то есть L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота является более стабильной, чем глутамин (то есть L-глутамин) в водном растворе (например, в среде, не содержащей сыворотки). В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует значительного количества глутамина в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует значительного количества пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует значительного количества глутамина (то есть L-глутамина) в течение по меньшей мере 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 14 дней в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления

синтетическая аминокислота не образует значительного количества глутамина (то есть L-глутамина) в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует значительного количества глутамина (то есть L-глутамина) в течение по меньшей мере 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 значительного количества глутамина (то есть L-глутамина) в течение по меньшей мере 1,2, 3, 4 или 5 лет в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует значительного количества пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака по меньшей мере в течение по меньшей мере 1,3, 5, 7, 9, 11 13 или 14 дней в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует значительного количества пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота не образует значительного количества пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере 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 значительного количества пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 лет в бессывороточной среде.

[0603] В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота растворима в водном растворе (например, в среде, не содержащей сыворотки). В некоторых вариантах осуществления растворимость синтетической аминокислоты в водном растворе выше, чем растворимость свободной формы глутамина (т.е. L-глутамина).

[0604] В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота способна транспортироваться в клетку, где она может превращаться в свободную форму глутамина (то есть L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка включает иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой генетически сконструированную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой генетически сконструированную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетку генетически конструируют для экспрессии рекомбинантного рецептора (например, химерного рецептора антигена). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой Т-клетки, экспрессирующие химерный рецептор антигена (CAR).

[0605] В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота представляет собой дипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота представляет собой трипептид. В некоторых

вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота представляет собой дипептидную форму L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамин).

[0606] В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 0,5 мМ - 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) равна или приблизительно равна 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, 125 мМ - 3 мМ, 125 мМ - 3,5 мМ, 1-5 мМ - 4 мМ, 125 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, включая указанные граничные значения. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в бессывороточной среде равна или приблизительно равна 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 - 10,5 мМ, 7,5 мМ - 12,5 мМ, 7,5 мМ - 15,5 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, включая указанные граничные значения. 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 не более или приблизительно не более 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, 1 мМ, 5 мМ, 1 мМ, 1 мМ, 5 мМ или 20 мМ.

[0607] В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация свободной формы глутамина (то есть L-глутамина) в бессывороточной среде приблизительно составляет 0,5 мМ - 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (то есть L-глутамина) в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (то есть L-глутамина) в бессывороточной среде равна или приблизительно равна 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, 125 мМ - 3 мМ, 125 мМ - 3,5 мМ, 1-5 мМ - 4 мМ, 125 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, включая указанные граничные значения. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (то есть L-глутамин) в бессывороточной среде равна или приблизительно равна или приблизительно равна 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 - 10,5 мМ, 7,5 мМ - 12,5 мМ, 7,5 мМ - 15,5 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, включая указанные граничные значения. В некоторых вариантах осуществления концентрация свободной формы глутамина (то есть 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 свободной формы глутамина (то есть L-глутамина) в бессывороточной среде составляет не более или приблизительно не более 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, 1 мМ, 5 мМ, 1 мМ, 1 мМ, 5 мМ или 20 мМ.

[0608] В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрация дипептидной формы L-глутамина, такой как L-аланил-L-глутамин, в бессывороточной среде находится в диапазоне от или приблизительно от 0,5 мМ до или приблизительно до 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 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 приблизительно от 0,5 мМ до или приблизительно до 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрация дипептидной формы L-глутамина в бессывороточной среде составляет или приблизительно составляет 2 мМ.

[0609] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда содержит по меньшей мере один белок. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок не является белком млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является белком человека или производным от белка человека. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления среда включают по меньшей мере один белок. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок не является белком млекопитающегом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является белком человека или производным от белка 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 изобретения белок включает одно или несколько из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно одного или нескольких из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

[0610] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит альбумин. В некоторых вариантах осуществления изобретения альбумин представляет собой альбумин человека или производное альбумина человека. В некоторых вариантах осуществления альбумин получают из сыворотки человека или плазмы человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения альбумин является рекомбинантным альбумином. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный альбумин происходит от альбумина человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный альбумин получают из источника, не являющегося человеком. В некоторых вариантах осуществления среда содержит природный альбумин. В некоторых вариантах осуществления изобретения природный альбумин получен от человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения природный альбумин не получен от человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация альбумина в бессывороточной среде составляет от или приблизительно от 0 мг/мл до или приблизительно до 2 мг/мл, от или приблизительно от 0 мг/мл до или приблизительно до 4 мг/мл, от или приблизительно от 0 мг/мл до приблизительно или приблизительно до 6 мг/мл, от или приблизительно от 0 мг/мл до или приблизительно до 8 мг/мл, от или приблизительно от 0 мг/мл до или приблизительно до 10 мг/мл, от или приблизительно от 0 мг/мл до или приблизительно до 12 мг/мл, от или приблизительно от 2 мг/мл до или приблизительно до 4 мг/мл, от или приблизительно от 2 мг/мл до или приблизительно до 6 мг/мл, от или приблизительно от 2 мг/мл до или приблизительно до 8 мг/мл, от или приблизительно от 2 мг/мл до или приблизительно до 10 мг/мл, от или приблизительно от 2 мг/мл до или приблизительно до 12 мг/мл, от или приблизительно от 4 мг/мл до или приблизительно до 6 мг/мл, от или приблизительно от 4 мг/мл до или приблизительно до 8 мг/мл, от или приблизительно от 4 мг/мл до или приблизительно до 10 мг/мл, от или приблизительно от 4 мг/мл до или приблизительно 12 мг/мл, от или приблизительно от 6 мг/мл до или приблизительно до 8 мг/мл, от или приблизительно от 6 мг/мл до или приблизительно до 10 мг/мл, от или приблизительно от 6 мг/мл до или приблизительно до 12 мг/мл, от или приблизительно от 8 мг/мл до или приблизительно до 10 мг/мл, от или приблизительно от 8 мг/мл до приблизительно 12 мг/мл, от или приблизительно от 10 мг/мл до или приблизительно до 12 мг/мл или от или приблизительно от 10 мг/мл до или приблизительно до 15 мг/мл, включая граничные значения. В некоторых вариантах осуществления, содержание альбумина в среде составляет 5 мг/мл или приблизительно 5 мг/мл.

[0611] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит трансферрин или заменитель трансферрина (такой как описано здесь). В некоторых вариантах осуществления изобретения трансферрин или заменитель трансферрина представляет собой трансферрин человека или трансферрин, полученный от человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансферрин или заменитель трансферрина получают из сыворотки или плазмы человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация трансферрина в бессывороточной среде составит от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно 50 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 100 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 150 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 200 мг./Л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л. от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от приблизительно 10 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от приблизительно 10 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от приблизительно 50 мг/л до или приблизительно до 100 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 150 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 200 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или до приблизительно 400 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от приблизительно 50 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 150 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 200 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 100 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 200 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или

приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 150 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 250 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 200 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 300 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 250 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от приблизительно 250 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от приблизительно 300 мг/л до или приблизительно до 350 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 300 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от приблизительно 300 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от приблизительно 300 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 400 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 6 50 мг/л, от или приблизительно от 350 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 450 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 400 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 500 мг/л, от или

приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 450 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, при или от приблизительно 500 мг/л до или приблизительно до 550 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 550 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 500 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 550 мг/л до или приблизительно до 600 мг/л, от или приблизительно от 550 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 550 мг/л, до или приблизительно до 750 мг/л, от или приблизительно от 600 мг/л до или приблизительно до 650 мг/л, от или приблизительно от 600 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л или от или приблизительно от 650 мг/л до или приблизительно до 750 мг/л. В некоторых вариантах осуществления концентрация трансферрина такова, что после объединения добавки с базальной средой (такой как описанная здесь), концентрация трансферрина в среде будет равна или приблизительно равна 100 мг/л. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация трансферрина такова, что после объединения добавки с базальной средой (такой как описанная здесь), концентрация трансферрина в среде концентрация трансферрина в среде составит от или приблизительно от 50 мг/л до или приблизительно до 150 мг/л.

[0612] В некоторых вариантах осуществления среда содержит инсулин или заменитель инсулина (такие как описанные здесь). В некоторых вариантах осуществления инсулин получают от человека. В некоторых вариантах осуществления инсулин представляет собой рекомбинантный инсулин. В некоторых вариантах выполнения инсулин является рекомбинантным инсулином человека. В некоторых вариантах осуществления концентрация инсулина (или заменителя инсулина) в бессывороточной среде составляет от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 2,5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 7,5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 10 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 12,5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 15 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 17,5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 22,5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 25 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 27,5 мг/л, от или приблизительно от 1 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 5 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 7,5 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 10 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 12,5 мг/л, от или

приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 15 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 17,5 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 22,5 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 25 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 27,5 мг/л, от или приблизительно от 2,5 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 7,5 мг/л, от приблизительно 5 мг/л до или приблизительно до 10 мг/л, от приблизительно 5 мг/л до или приблизительно до 12,5 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 15 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 17,5 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 22,5 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 25 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 27,5 мг/л, от или приблизительно от 5 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 7,5 мг/л до или приблизительно до 10 мг/л, от или приблизительно от 7,5 мг/л до или приблизительно до 12,5 мг/л, от или приблизительно от 7,5 мг/л. до или приблизительно до 15 мг/л, от или приблизительно от 7,5 мг/л до приблизительно 17,5 мг/л, от или приблизительно от 7,5 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 7,5 мг/л до или приблизительно до 22,5 мг/л от или приблизительно от 7,5 мг/л до или приблизительно до 25 мг/л, от приблизительно 7,5 мг/л до или приблизительно до 27,5 мг/л, от или приблизительно от 7,5 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 12,5 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 15 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 17,5 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 22,5 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 25 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 27,5 мг/л, от или приблизительно от 10 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 12,5 мг/л до или приблизительно до 15 мг/л, от или приблизительно от 12,5 мг/л до или приблизительно до 17,5 мг/л, от или приблизительно от 12,5 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 12,5 мг/л до или приблизительно до 22,5 мг/л, от или приблизительно от 12,5 мг/л до или приблизительно до 25 мг/л, приблизительно или приблизительно 12,5 мг/л до или приблизительно до 27,5 мг/л, от или приблизительно от 12,5 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 15 мг/л до или от приблизительно 17,5 мг/л, до или приблизительно до 15 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 15 мг/л до или приблизительно до 22,5 мг/л, от или приблизительно от 15 мг/л до или приблизительно до 25 мг/л, от или приблизительно от 15 мг/л до или приблизительно до 27,5 мг/л, от или приблизительно от 15 мг/л до или приблизительно до 30 мг/л, от или приблизительно от 17,5 мг/л до или приблизительно до 20 мг/л, от или приблизительно от 17,5 мг/л до или приблизительно до 22,5 мг/л, от или приблизительно от 17,5 мг/л до или приблизительно до 25 мг/л, от или

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

[0613] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда не содержит фенолового красного. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит феноловый красный.

[0614] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда содержит питательную смесь неорганических солей, сахаров, аминокислот, а также необязательно содержит витамины, органические кислоты, антиоксиданты, липиды, факторы роста, N-ацетилцистеин, этаноламин и/или буферы. Примеры таких добавок включают те, которые описаны здесь выше, включая неорганические соли, сахара, аминокислоты, витамины, органические кислоты, антиоксиданты, липиды, факторы роста, N-ацетилцистеин, этаноламин и/или буферы.

[0615] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит один или несколько ингредиентов, выбранных из одного или нескольких ингредиентов: из одного или нескольких антиоксидантов, одного или нескольких альбуминов или заменителей альбумина, одного или нескольких липидных агентов, одного или нескольких инсулинов или заменителей инсулина, одного или нескольких трансферринов или заменителей трансферрина, одного или нескольких микроэлементов, одного или нескольких глюкокортикоидов, одной или нескольких неорганических солей, одного или нескольких источников энергии, одного или нескольких буферных агентов, одной или нескольких солей пирувата, одного или нескольких индикаторов pH, одной или нескольких аминокислот и одного или несколько витаминов. В некоторых вариантах осуществления антиоксиданты выбирают 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 представляет собой сывороточный альбумин человека. В некоторых вариантах осуществления липидными агентами являются Human Ex-Cyte® и этаноламин. В некоторых вариантах осуществления инсулин представляет собой цинк-инсулин человека. В некоторых вариантах осуществления трансферрин представляет собой насыщенный железом трансферрин человека. В

некоторых вариантах осуществления глюкокортикоид представляет собой гидрокортизон. В некоторых вариантах осуществления изобретения неорганический солевой ингредиент включает одну или несколько неорганических солей, выбранных из группы, состоящей из одной или нескольких солей кальция, одной или нескольких солей калия, одной или нескольких солей магния, одной или нескольких солей натрия, одной или нескольких карбонатных солей и одной или нескольких фосфатных солей. В некоторых вариантах осуществления изобретения источником энергии является D-глюкоза. В некоторых вариантах осуществления буферный агент представляет собой HEPES. В некоторых вариантах осуществления соль пирувата представляет собой пируват натрия. В некоторых вариантах осуществления индикатор pH представляет собой феноловый красный. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный ингредиент включает одну или несколько 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-глутамина, HCl L-аргинина, L-метионина, L-пролина, L-гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина и L-валина, и их солей и производных. В некоторых вариантах осуществления изобретения витамин включает один или несколько витаминов, выбранных из группы, состоящей из биотина, D-пантотената кальция, хлорида холина, фолиевой кислоты, i-инозита, ниацинамида, пиридоксаля HCl, рибофлавина, тиамина HCl и витамина B12 и их производных. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингредиенты включают N-ацетил-L-цистеин, 2-меркаптоэтанол, сывороточный альбумин человека, ацетат D, L-токоферола, Human Ex-Cyte®, этаноламин, цинк-инсулин человека, насыщенный железом трансферрин человека, Se^{4+}, гидрокортизон, ионы 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, D-пантотенат кальция, хлорид холин, фолиевая кислота, i-инозит, ниацинамид, пиридоксаль HCl, рибофлавин, тиамин HCl и витамин B12.

[0616] В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается бессывороточная среда, содержащая базальную среду и по меньшей мере одну добавку. Различные примеры базальной среды и добавок описаны здесь, например, в Разделе, приведенном выше.

[0617] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда содержит от или приблизительно от 90% до или приблизительно до 97,5% (об./об.) базальной среды, от или приблизительно от 2,5% до или приблизительно до 10% (об./об.) добавки, например первой добавки и/или второй добавки. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит от или приблизительно от 90% до или приблизительно до 97,5% (об./об.) базальной среды, от или приблизительно от 1,25% до

или приблизительно до 5% (об./об.) первой добавки, и от или приблизительно от 1,25% до или приблизительно до 5% (об./об.) второй добавки.

[0618] В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается бессывороточная среда, содержащая базальную среду, первую добавку и вторую добавку. В некоторых вариантах осуществления базальная среда содержит жидкость, содержащую синтетическую аминокислоту (например, дипептидную форму L-глутамина, например L-аланил-L-глутамина), и где базальная среда не содержит или по существу не содержит свободной формы глутамина (т.е. L-глутамина) и/или белка. В некоторых вариантах осуществления первая добавка содержит свободную форму глутамина (то есть L-глутамина), где первую добавку замораживают или хранят при температуре ниже комнатной температуры (например, при 20, 10, 15, 5, 0, -5, -10, -15 или -20°C) в течение большей части времени после введения глутамина в качестве компонента и до предполагаемого использования (например, использования в качестве добавки для базальной среды). В некоторых вариантах осуществления первая добавка содержит свободную форму глутамина (то есть L-глутамина), где первую добавку замораживают или хранят при температуре ниже комнатной температуры (например, при 20, 10, 15, 5, 0, -5, -10, -15 или -20°C) непосредственно перед объединением со средой (например, базальной средой). В некоторых вариантах осуществления вторая добавка содержит альбумин, N-ацетил-L-цистеин (NAC) и/или этаноламин. В некоторых вариантах осуществления вторая добавка включает один или несколько ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из одного или нескольких антиоксидантов, одного или нескольких альбуминов или заменителей альбумина, одного или нескольких липидных агентов, одного или нескольких инсулинов или заменителей инсулина, одного или нескольких трансферринов или заменителей трансферрина, одного или нескольких микроэлементов и одного или нескольких глюкокортикоидов.

[0619] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит один или несколько цитокинов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько цитокинов являются рекомбинантными цитокинами. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины человека. В некоторых вариантах осуществления один или несколько цитокинов связываются и/или способны связываться с рецепторами, которые экспрессируются и/или являются эндогенными по отношению к Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают член семейства 4-альфа-спиральных пучков цитокинов. В некоторых вариантах осуществления члены семейства 4-альфа-спиральных пучков цитокинов включают, без ограничения, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин 12 (IL-12), интерлейкин-15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-7. В конкретных

вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-7. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный IL-2. В некоторых вариантах осуществления Цитокин включает IL-2. В некоторых вариантах осуществления один или несколько цитокинов выбирают из IL-2, IL-7 или IL-15.

[0620] В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрация цитокина находится в диапазоне, приблизительно равном от или приблизительно от 1 МЕ/мл до или приблизительно до 2000 МЕ/мл, от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 100 МЕ/мл, от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл, от или приблизительно от 500 МЕ/мл до или приблизительно до 1400 МЕ/мл, от или приблизительно от 250 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл или от или приблизительно от 500 МЕ/мл до или приблизительно до 2500 МЕ/мл.

[0621] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 (например, рекомбинантного IL-2 человека) составляет от или приблизительно от 2 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 250 МЕ/мл, от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, или от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 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 концентрация IL-2 составляет или приблизительно составляет 100 МЕ/мл. В некоторых вариантах концентрация IL-2 составляет или приблизительно составляет 200 МЕ/мл.

[0622] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда содержит IL-7, например, рекомбинантный IL-7 человека, и концентрация IL-7 приблизительно составляет от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 5000 МЕ/мл, от или приблизительно от 500 МЕ/мл до или приблизительно до 2000 МЕ/мл, от или приблизительно от 600 МЕ/мл до или приблизительно до 1500 МЕ/мл, от или приблизительно от 500 МЕ/мл до или приблизительно до 2500 МЕ/мл, от или приблизительно от 750 МЕ/мл до или приблизительно 1500 МЕ/мл, или от или приблизительно от 1000 МЕ/мл до или приблизительно 21000 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления изобретения концентрация IL-7 равна или приблизительно равна 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 изобретения концентрация IL-7 приблизительно равна 600 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация IL-7 приблизительно равна 1200 МЕ/мл.

[0623] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда содержит IL-15, и концентрация IL-15, например, рекомбинантного IL-15 человека, составляет от или приблизительно от 2 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, от или приблизительно от 0,1 МЕ/мл до или приблизительно до 200 МЕ/мл, от или приблизительно от 1 МЕ/мл до или приблизительно до 50 МЕ/мл, от или приблизительно от 5 МЕ/мл до или приблизительно до 25 МЕ/мл, от или приблизительно от 25 МЕ/мл, до или приблизительно до 50 МЕ/мл, от или приблизительно от 5 МЕ/мл, до или приблизительно до 15 МЕ/мл или от приблизительно 10 МЕ/мл до или приблизительно 50 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления концентрация IL-15 равна или приблизительно равна 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. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-15 составляет или приблизительно составляет 100 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-15 равна или приблизительно равна 200 МЕ/мл.

[0624] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит базальную среду с добавлением рекомбинантного IL-2, рекомбинантный IL-7 и/или рекомбинантного IL-15, например рекомбинантного IL-2 человека, рекомбинантного IL-7 человека и/или рекомбинантного IL-15 человека. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит рекомбинантный IL-2 в количестве от или приблизительно от 2 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, рекомбинантный IL-7 в количестве от или приблизительно от 10 МЕ/мл до или приблизительно до 5000 МЕ/мл и рекомбинантный IL-15 в количестве от или приблизительно от 2 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит рекомбинантный IL-2 в количестве от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл, рекомбинантный IL-7 в количестве от или приблизительно от 100 МЕ/мл до или приблизительно до 2000 МЕ/мл и рекомбинантный IL-15 в количестве от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 500 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит рекомбинантный IL-2 в количестве от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 150 МЕ/мл, рекомбинантный IL-7 в количестве от или приблизительно от 500 МЕ/мл до или приблизительно до 1000 МЕ/мл и рекомбинантный IL-15 в количестве от или приблизительно от 50 МЕ/мл до или приблизительно до 150 МЕ/мл, например, для использования при стимуляции/активации и/или для конструирования клеток/композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит рекомбинантный IL-2 в количестве от или приблизительно от 150 МЕ/мл до или приблизительно до 250 МЕ/мл, рекомбинантный IL-7 в количестве от или приблизительно от 1000 МЕ/мл до или приблизительно до 1500 МЕ/мл и рекомбинантный IL-15 в количестве от или приблизительно от 150 МЕ/мл до или приблизительно до 250 МЕ/мл,

например, для использования при культивировании или размножении клеток/композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда, используемая при культивировании или размножении клеток/композиции клеток, содержит более высокие концентрации одного или нескольких цитокинов, чем бессывороточные среды, используемые для стимуляции/активации и/или конструирования клеток/композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда, используемая при культивировании или размножении клеток/композиции клеток, содержит один или нескольких цитокинов, концентрации которых приблизительно или по меньшей мере приблизительно в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3,0 раз выше, чем в бессывороточных средах, используемых для стимуляции/активации и/или конструирования клеток композиции клеток.

[0625] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда представляет собой концентрированную композицию среды. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда не является концентрированной композицией среды. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда является концентрированной от или приблизительно от 2X до или приблизительно до 100X. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда представляет собой по меньшей мере приблизительно концентрат 10X. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда может храниться при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C.

[0626] В некоторых вариантах осуществления изобретения среда способна культивировать клетки по меньшей мере 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней или более без дополнительной добавки L-глутамина, дипептидной формы глутамина или другой формы глутамина.

[0627] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда способна стимулировать размножение клеток в течение по меньшей мере 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней или более без дополнительной добавки L-глутамина, дипептидной формы глутамина или другой формы глутамина.

[0628] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда поддерживает или способствует размножению клеток. В некоторых вариантах осуществления среда поддерживает или способствует жизнеспособности клеток. В некоторых вариантах осуществления среда поддерживает или способствует активации клеток.

[0629] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка включает иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка включает первичную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления первичная иммунная клетка включает генетически сконструированную 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 представляет собой генетически сконструированную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетку генетически конструируют для экспрессии рекомбинантного рецептора (например, химерного рецептора антигена). В некоторых вариантах осуществления Т-клетка включает Т-клетку, экспрессирующую химерный рецептор антигена (CAR).

[0630] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда поддерживает или способствует жизнеспособности, размножению и/или активации клеток, где клетки, культивируемые с бессывороточной средой, достигают сравнимых функциональных свойств (например, жизнеспособности, уровня размножения и продуцирования цитокина или цитокинов) клеток, как и у клеток, культивируемых с содержащей сыворотку средой, такой как среда, содержащая приблизительно 5-10% (об./об.) сыворотки человека.

D Способы получения бессывороточных сред

[0631] В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается способ получения бессывороточной среды, включающий объединение: (a) базальной среды, содержащей синтетическую аминокислоту, способную превращаться в свободную форму глутамина (например, в L-глутамин) в клеточной культуре; (b) первую добавку, содержащую свободную форму глутамина (т.е. L-глутамин), где первая добавка была заморожена в течение по меньшей мере части времени после того, как L-глутамин включен в состав среды в качестве ее компонента, и до объединения. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота представляет собой дипептидную форму L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления базальная среда не содержит сыворотки. В некоторых вариантах осуществления базальная среда представляет собой жидкость и/или она не была заморожена перед объединением и/или в протоколе ее не рекомендуют для замораживания при хранении. В некоторых вариантах осуществления первую добавку замораживают в течение большей части времени после того, как L-глутамин включен в состав среды в качестве ее компонента, и перед объединением ее с базальной средой. В некоторых вариантах осуществления первую добавку замораживают и оттаивают перед объединением.

[0632] В некоторых вариантах осуществления изобретения первую добавку размораживают до жидкого состояния перед объединением с базальной средой за время не более или приблизительно не более одной недели, например, не более или приблизительно не более чем за 6, 5, 4, 3, 2 или 1 день, обычно не более или приблизительно не более за 12 часов, 6 часов, 2 часа, 1 час или 30 минут. В некоторых вариантах осуществления первую добавку, содержащую L-глутамин, сохраняют в замороженном состоянии (например, в течение 6, 12, 16, 24, 36, 48 часов) и размораживают непосредственно перед объединением. В некоторых вариантах осуществления первая добавка, содержащая L-глутамин, сораняют в жидком виде в

течение менее или приблизительно менее 48, 24, 16, 12, 8, 4 или 2 часов перед объединением с базальной средой. В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетическая аминокислота представляет собой дипептид L-глутамина. В некоторых вариантах осуществления синтетическая аминокислота представляет собой L-аланил-L-глутамин.

[0633] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда содержит или приблизительно содержит от 90% до 98,75% (об./об.) базальной среды и содержит или приблизительно содержит от 1,25% до 10% (об./об.) первой добавки. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит или приблизительно содержит от 90% до 97,5% (об./об.) базальной среды и содержит или приблизительно содержит от 1,25% до 5% (об./об.) первой добавки. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит или приблизительно содержит 95% (об./об.) базальной среды и содержит или приблизительно содержит 2,5% ± 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 по меньшей мере приблизительно 25 миллилитров первой добавки.

[0634] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает объединение второй добавки. В некоторых вариантах осуществления вторая добавка содержит один или несколько дополнительных компонентов, таких как описаны выше, включая один или несколько антиоксидантов, один или несколько альбуминов или заменителей альбумина, один или несколько липидных агентов, один или несколько инсулинов или заменителей инсулина, один или несколько трансферринов или заменителей трансферрина, один или несколько микроэлементов и один или несколько глюкокортикоидов. Примеры компонентов второй добавки описаны выше.

[0635] В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая добавка содержит альбумин, N-ацетилцистеин (NAC) и этаноламин. В некоторых вариантах осуществления вторая добавка содержит альбумин, N-ацетилцистеин (NAC) и этаноламин, где концентрация альбумина, NAC и/или этаноламина такова, что после объединения второй добавки с базальной средой (такой как описанно здесь) концентрация альбумина, NAC и/или этаноламина является, по существу, такой же, как описано здесь. В некоторых вариантах осуществления альбумин представляет собой альбумин, полученный от человека. В некоторых вариантах альбумин представляет собой альбумин человека, полученный из плазмы или сыворотки человека. В некоторых вариантах осуществления вторая добавка представляет собой жидкость и не содержит или не содержит значительного количества свободной формы глутамина (то есть L-глутамина).

[0636] В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая добавка включает добавку OpTmizer ® (Thermofisher, часть A1048503).

[0637] В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая добавка представляет собой жидкость. В некоторых вариантах осуществления вторую добавку не замораживают или не рекомендуется замораживать для хранения. В некоторых вариантах

бессывороточная среда содержит вторую добавку в количестве приблизительно от 1,25% до 5% (об./об.), например, как или приблизительно 2,5% ± 0,2%, как или приблизительно 2,5%, или 2,6%. В некоторых вариантах осуществления на литр базальной среды добавляют приблизительно 26 миллилитров второй добавки.

[0638] В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда содержит приблизительно от 90% до 97,5% (об./об.) базальной среды, приблизительно от 1,25% до 5% (об./об.) первой добавки и приблизительно от 1,25% до 5% (об./об.) второй добавки. В некоторых вариантах осуществления изобретения бессывороточная среда содержит приблизительно 95% (об./об.) базальной среды, приблизительно 2,5% ± 0,2% (об./об.) первой добавки и приблизительно 2,5% ± 0,2% (об./об.) второй добавки.

III. Рекомбинантные рецепторы

[0639] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, которые обрабатывают, подвергают обработке, конструируют и/или получают описанными здесь способами, например способами, описанными в Разделе I, содержат или экспрессируют, или их конструируют таким образом, чтобы они содержали или экспрессировали рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, например химерный рецептор антигена (CAR), или Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления способы, представленные здесь, обеспечивают получение и/или способны обеспечить получение клеток, или популяции клеток, или композиции клеток, содержащих или обогащенных клетками, которые сконструированы для экспрессии или содержат рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления обрабатывают, подвергают обработке, конструируют и/или получают Т-клетки, или популяции клеток, или композиции Т-клеток.

[0640] В некоторых вариантах осуществления клетки включают одну или более нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, и тем самым экспрессируют рекомбинантные или генно-инженерные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления перенос гена осуществляется путем первой стимуляции клеток, например, путем сочетания его со стимулом, который индуцирует ответную реакцию, такую как пролиферация, выживание и/или активация, например, определяемую по экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до количеств, достаточных для клинических применений.

[0641] Рецепторами являются рецептор антигена и рецепторы, содержащие один или несколько их компонентов. Рекомбинантные рецепторы могут включать химерные рецепторы, такие как те, которые содержат лиганд-связывающие домены или их связывающие фрагменты и внутриклеточные сигнальные домены или области, функциональные не являющиеся TCR рецепторы антигенов, например химерные рецепторы антигенов (CAR), и другие антигенсвязывающие рецепторы, такие как трансгенные Т-клеточные рецепторы (TCR), такие как рекомбинантные или трансгенные TCR, химерные рецепторы аутоантител (CAAR) и компоненты любых из вышеуказанных.

Рекомбинантный рецептор, такой как CAR, обычно включает внеклеточный антигенсвязывающий домен (или лиганд), связанный с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, и в некоторых аспектах посредством линкеров и/или трансмембранного домена (доменов).

1. Химерные рецепторы антигенов (CAR)

[0642] В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагаются сконструированные клетки, такие как Т-клетки, которые экспрессируют CAR, специфичные в отношении конкретного антигена (или маркера или лиганда), такого как антиген, экспрессируемый на поверхности конкретного типа клеток. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах антиген избирательно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках, характерных или связанных с заболеванием или состоянием, например, с опухолевыми или патогенными клетками, по сравнению с нормальными клетками, или клетками не-мишенями или тканями. В других вариантах антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на сконструированных клетках.

[0643] В конкретных вариантах осуществления изобретения рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор, содержит внутриклеточную сигнальную область, которая включает цитоплазматический сигнальный домен или область (также взаимозаменяемо называемые внутриклеточным сигнальным доменом или областью), такие как цитоплазматический (внутриклеточный) участок, способный индуцировать первичный активационный сигнал в Т-клетке, например, цитоплазматический сигнальный домен или область Т-клеточного рецептора (TCR) (например, цитоплазматический сигнальный домен или область дзета-цепи в CD3-дзета (CD3ζ) цепи или ее функциональный вариант или сигнальная часть) и/или который содержит активирующий мотив иммунорецепторов на основе тирозина (ITAM).

[0644] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный рецептор дополнительно содержит домен связывания внеклеточного лиганда, который специфически связывается с антигеном (например, с антигеном). В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор представляет собой CAR, который содержит внеклеточный антиген-распознающий домен, который специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления лиганд, такой как антиген, представляет собой белок, экспрессируемый на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой TCR-подобный CAR, а антиген представляет собой процессированный пептидный антиген, такой как пептидный антиген внутриклеточного белка, который, подобно TCR, распознается на клеточной поверхности в связи с молекулой главного комплекса гистосовместимости (MHC).

[0645] Примеры антигенных рецепторов, включая CAR, и способы конструирования и введения таких рецепторов в клетки включают те, которые описаны, например, в публикациях международных заявок на патенты: WO 2000/14257, WO

2013/126726, WO 2012/129514, WO 2014/031687, WO 2013/166321, WO 2013/071154, WO 2013/123061, публикациях заявок на патенты США: US 2002131960, US 2013287748, US 20130149337, патентах США: US 6451995,US 7446190, US 8252592, US 8339645, US 8398282, US 7446179, US 6410319, US 7070995, US 7265209, US 7354762, US 7446191, US 8324353 и US 8479118, и Европейской патентной заявке EP2537416, и/или те, которые описаны в публикациях Sadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4):e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5):633-39; Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2):160-75. В некоторых аспектах рецепторы антигенов включают CAR, описанный в патенте США US 7446190, и рецепторы, описанные в публикации международной заявки WO 2014/055668 A1. Примеры CAR включают CAR, раскрытые в любой из вышеуказанных публикаций, таких как WO 2014/031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патент США US 7446190, патент США US 8389282, Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9):689-701; и Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5(177), а также в WO 2014/031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патенте США US 7446190 и патенте США US 8389282.

[0646] В некоторых вариантах осуществления изобретения CAR конструируют со специфичностью в отношении конкретного антигена (или маркера или лиганда), такого как антиген, экспрессируемый в конкретном типе клеток, на который будет направлена адоптивная терапия, например, раковый маркер, и/или антиген, предназначенный для индукции сдерживающей реакции, такой как антиген, экспрессируемый на нормальных или не пораженных болезнью клетках. Таким образом, CAR, как правило, включает в своей экстраклеточной (внеклеточной) части одну или более антигенсвязывающих молекул, таких как один или более антигенсвязывающих фрагментов, доменов или частей, или один или более вариабельных доменов антител, и/или молекул антител. В некоторых вариантах осуществления CAR включает антигенсвязывающую часть или части молекулы антитела, такие как одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), происходящий из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) моноклонального антитела (mAb).

[0647] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающую часть экспрессируется на клетках в виде части рекомбинантного рецептора, такого как рецептор антигена. Среди рецепторов антигенов находятся функциональные не являющиеся TCR рецепторы антигенов, такие как химерные рецепторы антигенов (CAR). Как правило, CAR, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который проявляет TCR-подобную специфичность к комплексам пептид-MHC, также может называться CAR типа TCR. В некоторых вариантах осуществления экстраклеточный (внеклеточны) антигенсвязывающий домен, специфический для комплекса MHC-пептид, CAR типа TCR связан с одним или более внутриклеточных сигнальных компонентов, в некоторых аспектах через линкеры и/или трансмембранный домен(ы). В некоторых вариантах осуществления такие молекулы

обычно могут имитировать или аппроксимировать сигнал через природный рецептор антигена, такой как TCR, и, необязательно, сигнал через такой рецептор в сочетании с костимулирующим рецептором.

[0648] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор (например CAR), включает лиганд-связывающий домен, который связывается, например специфически связывается, с антигеном (или лигандом). Среди антигенов, на которые нацелены химерные рецепторы, есть антигены, экспрессируемые в связи с заболеванием, состоянием или типом клеток, который является мишенью при адоптивной клеточной терапии. К числу заболеваний и состояний относятся пролиферативные, неопластические и злокачественные заболевания и нарушения, включая раки и опухоли, в том числе гематологические раковые заболевания, раки иммунной системы, такие как лимфомы, лейкозы и/или миеломы, такие как В-клеточные, Т-клеточные и миелоидные лейкозы, лимфомы и множественные миеломы.

[0649] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген (или лиганд) представляет собой полипептид. 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, опухоли или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или не являющимися мишенями клетками или тканями. В других вариантах осуществления антиген экспрессируется в нормальных клетках и/или экспрессируется в сконструированных клетках.

[0650] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), который специфически распознает антиген, такой как интактный антиген, экспрессируемый на поверхности клетки.

[0651] В некоторых вариантах осуществления антиген (или лиганд) представляет собой опухолевый антиген или раковый маркер. В некоторых вариантах осуществления антиген (или лиганд) представляет собой или включает интегрин αvβ6 (интегрин avb6), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), антиген рака яичка, антиген 1В рака/яичка (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин А2, СС мотив лиганда хемокина 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, протеогликан 4 хондроитинсульфата (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), мутация рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин В2, рецептор эфрина А2 (EPHa2), рецептор эстрогена, Fc-подобный рецептор 5 (FCRL5; также известный как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фетальный ацетилхолиновый рецептор (фетальный AchR), белок, связывающий фолат (FBP), альфа-рецептор фолата, ганглиозид GD2, О-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), G-белок, сопряженный с рецептором семейства С группы 5,

член D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, высокомолекулярный антиген, связанный с меланомой человека (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита B, лейкоцитарный антиген A1 человека (HLA-A1), лейкоцитарный антиген A2 человека (HLA-A2), альфа-рецептор IL-22 (IL-22Rα), альфа-2 рецептор IL-13 (IL-13Rα2), рецептор, содержащий домен вставки киназы (kdr), легкая цепь каппа, молекула адгезии клеток L1 (L1-CAM), эпитоп CE7 L1-CAM, богатый лейцином повтор, содержащий 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, связанный с меланомой антиген 1 (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), c-Met, мышиный цитомегаловирус (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, члены класса D группы 2 природных киллеров (NKG2D), мелан A (MART-1), молекула адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетальный антиген, преимущественно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, специфический антиген простаты, антиген стволовых клеток простаты (PSCA), специфический мембранный антиген простаты (PSMA), рецепторная тирозинкиназа, рецептора-сироты рецепторных тирозинкиназ типа 1 (ROR1), сурвивин, гликопротеин трофобластов (TPBG, также известный как 5T4), гликопротеин 72, связанный с опухолью (TAG72), связанный с тирозиназой белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), связанный с тирозиназой 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), опухоль Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или экспрессируемый патогеном антиген sed, или антиген, связанный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены, на которые нацелены рецепторы в некоторых вариантах осуществления, включают в себя антигены, связанные с воспалением B-клеток, из числа известных маркеров B-клеток. 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.

[0652] В некоторых вариантах осуществления изобретения CAR представляет собой анти-BCMA CAR, который является специфическим для BCMA, например, BCMA человека. Рецепторы химерного антигена, содержащие антитела против BCMA, включая антитела против BCMA мыши и антитела человека против антитела человека, и клетки, экспрессирующие такие химерные рецепторы, которые описаны ранее (см. Carpenter et al. Clin Cancer Res. 2013, l9 (8):2048-2060, WO 2016/090320, WO 2016/090327, WO 2010/104949A2 и WO 2017/173256). В некоторых вариантах антиген или антигенсвязывающий домен представляет собой BCMA. В некоторых вариантах scFv содержит VH и VL, полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к BCMA. В некоторых вариантах антитело или фрагмент антитела, который связывает BCMA, представляет собой или содержит VH и VL из антитела или фрагмента антитела, описанного в международных патентных заявках WO 2016/090327 и WO 2016/090320.

[0653] В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-BCMA CAR содержит антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH) и/или вариабельную область легкой цепи (VL), полученной из антитела, описанного в WO 2016/090320 или WO 2016/090327. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит VH, представленный в SEQ ID NO: 30, и VL, представленный в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит VH, представленный в SEQ ID NO: 32, и VL, представленный в SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит VH, представленный в SEQ ID NO: 34, и VL, представленный в SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит VH, представленный в SEQ ID NO: 43, и VL, представленный в SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит VH, представленный в SEQ ID NO: 45, и и VL, представленный в SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления VH или VL имеет последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности любой из вышеуказанных последовательностей VH или VL, и сохраняет способность связывания с BCMA. В некоторых вариантах осуществления изобретения VH-область является аминоконцевой областью по отношению к VL-области. В некоторых вариантах осуществления VH-область является карбоксиконцевой областью по отношению к VL-области.

[0654] В некоторых вариантах выполнения антиген или антигенсвязывающий домен представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH и VL из антитела или фрагмента антитела, специфического для CD19. В некоторых вариантах антитело или фрагмент антитела, который связывается с CD19, представляет собой мышиное антитело, такое как FMC63 и SJ25C1. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела представляет собой человеческое антитело, например, как описано в патентной публикации США US 2016/0152723.

[0655] В некоторых вариантах осуществления изобретения CAR является анти-CD19 CAR, который специфичен для CD19, например CD19 человека. В некоторых вариантах осуществления домены scFv и/или VH получены из FMC63. FMC63 обычно относится к мышиному моноклональному антителу IgG1, полученному против клеток Nalm-1 и Nalm-16, экспрессирующих CD19 происходящих от человека (Ling, N. R., et al. (1987). Leucocyte typing III. 302). В некоторых вариантах осуществления, антитело FMC63 включает CDR-H1 и CDR-H2, представленные соответственно в SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51, и CDR-H3, представленная в SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 66, и CDR-L1, представленная в SEQ ID NO: 47, и CDR-L2, представленная в SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 67, и CDR-L3, представленная в SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления, антитела FMC63 включают вариабельный участок тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54.

[0656] В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv включает вариабельную область легкой цепи, 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 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 50, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 5l и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 53, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представлен в SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, по порядку, VH, линкер и VL. В некоторых вариантах выполнения scFv содержит, по порядку, VL, линкер и VH. В некоторых вариантах осуществления scFv кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 69, или последовательностью, которая идентична последовательности SEQ ID NO: 69 по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. В некоторых вариантах выполнения scFv содержит последовательность аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 55, или последовательность, которая идентична последовательности SEQ ID NO: 55 по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%,93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

[0657] В некоторых вариантах осуществления scFv происходит из SJ25C1. SJ25C1 представляет собой мышиное моноклональное антитело подкласса IgG1 против клеток Nalm-1 и Nalm-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 соответственно в SEQ ID NO: 59-61, и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные соответственно в SEQ ID NO: 56-58. В некоторых вариантах осуществления антитело SJ25C1 включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

[0658] В некоторых вариантах осуществления изобретения scFv включает вариабельную область легкой цепи, 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 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR-H1 SEQ ID NO: 59, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO: 60 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO: 6l. В некоторых вариантах осуществления scFv включает вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 62, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 63. В некоторых

вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепь соединены с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представлен в SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, по порядку, VH, линкер и VL. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, по порядку, VL, линкер и VR. В некоторых вариантах выполнения scFv содержит последовательность аминокислот, представленных в SEQ ID NO: 65, или последовательность, которая идентична последовательности SEQ ID NO: 65 по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%,93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

[0659] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой CD20. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH и VL, происходящие из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD20. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, связывающиеся с CD20, представляет собой антитело, которое является ритуксимаба или его производным, таким как ритуксимаб scFv.

[0660] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой CD22. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH и VL, происходящие из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD22. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, связывающиеся с CD22, представляет собой антитело, которое является m97l или его производным, таким как m97l scFv.

[0661] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген или антигенсвязывающий домен представляет собой GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH и VF, происходящие из антитела или фрагмента антитела, специфичного к GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, связывающиеся с GPRC5D, представляет собой или содержит VH и VF антитела или фрагмента антитела, описанного в международных патентных заявках WO 2016/090329 и WO 2016/090312.

[0662] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, такой как scFv, который включает один или несколько линкеров, соединяющих два домена или области антитела, такие как вариабельная область тяжелой цепи (VH) и вариабельная область легкой цепи (VL). Линкер обычно представляет собой пептидный линкер, например, гибкий и/или растворимый пептидный линкер. Среди линкеров имеются богатые глицином и серином и/или в некоторых случаях треонином. В некоторых вариантах линкеры дополнительно включают заряженные аминокислотные остатки, такие как лизин и/или глутамат, которые могут улучшать растворимость. В некоторых вариантах линкеры дополнительно включают один или несколько остатков пролина. В некоторых аспектах линкеры, обогащенные глицином и серином (и/или треонином), включают по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% такую аминокислоту

(аминокислты). В некоторых вариантах они включают по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 70% или 75% остатков глицина, серина и/или треонина. В некоторых вариантах осуществления линкер состоит по существу полностью из остатков глицина, серина и/или треонина. Линкеры обычно имеют длину от приблизительно 5 до приблизительно 50 аминокислот, обычно от приблизительно 10 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 случаях от 10 до 25 аминокислот в длину. Примеры линкеров включают линкеры, имеющие различное количество повторов последовательности GGGGS (4GS; SEQ ID NO: 36) или GGGS (3GS; SEQ ID NO: 37), например, 2, 3, 4 и 5 повторов такой последовательности. Типовые линкеры включают такие линкеры, имеющие или состоящие из набора последовательностей SEQ ID NO: 38 (GGGGSGGGGSGGGGS), SEQ ID NO: 39 (GSTSGSGKPGSGGSTKG) или SEQ ID NO: 40 (SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA).

[0663] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой или включает патоген-специфический или экспрессируемый патогеном антиген. В некоторых вариантах антиген представляет собой вирусный антиген (такой как вирусный антиген из ВИЧ, HCV, HBV и т.п.), бактериальные антигены и/или антигены паразитов. В некоторых вариантах осуществления изобретения CAR включает TCR-подобное антитело, в частности, ак антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например scFv), специфически распознающие внутриклеточный антиген, такой как ассоциированный с опухолью антиген, представленный на клеточной поверхности в виде комплекса MHC-пептид. В некоторых вариантах антитело или его антигенсвязывающая часть, которые распознают комплекс MHC-пептид, могут быть экспрессированы на клетках как часть рекомбинантного рецептора, такого как рецептор антигена. Среди рецепторов антигенов находятся функциональные не являющиеся TCR рецепторы антигенов, такие как химерные рецепторы антигенов (CAR). Как правило, CAR, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который проявляет TCR-подобную специфичность к комплексам пептид-MHC, также может называться CAR типа TCR.

[0664] Ссылка на «главный комплекс гистосовместимости» (MHC) относится к белку, обычно гликопротеину, который содержит полиморфный пептид-связывающий сайт или связывающую бороздку, который может, в некоторых случаях, образовывать комплекс с пептидными антигенами полипептидов, включая процессированные клеточным аппаратом пептидные антигены. В некоторых случаях молекулы MHC могут быть представлены или экспрессированы на поверхности клетки, в том числе в виде комплекса с пептидом, т.е. комплекса MHC-пептид, для презентации антигена в конформации, распознаваемой рецептором антигена на Т-клетках, таким как TCR или TCR-подобное антитело. Как правило, молекулы MHC класса I представляют собой гетеродимеры, имеющие простирающуюся через мембрану α-цепь, в некоторых случаях с тремя α-доменами, и нековалентно связанный β2-микроглобулин. Как правило, молекулы MHC класса II состоят из двух трансмембранных гликопротеинов, α и β, оба из которых

обычно простираются через мембрану. Молекула MHC может включать эффективную часть MHC, которая содержит антигенсвязывающий сайт или сайты для связывания пептида и последовательности, необходимые для распознавания соответствующим рецептором антигена. В некоторых вариантах осуществления молекулы MHC класса I доставляют пептиды, происходящие из цитозоля, на поверхность клетки, где комплекс MHC-пептид распознается Т-клетками, такими как обычно CD8+ Т-клетки, но в некоторых случаях CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления молекулы MHC класса II доставляют пептиды, происходящие из везикулярной системы, на поверхность клетки, где они обычно распознаются CD4+ Т-клетками. Как правило, молекулы MHC кодируются группой связанных локусов, которые в совокупности называются H-2 в мышином и человеческом лейкоцитарном антигене (HLA). Следовательно, обычно MHC человека может также упоминаться как лейкоцитарный антиген человека (HLA).

[0665] Термин «комплекс MHC-пептид» или «комплекс пептид-MHC» или его варианты относится к комплексу или ассоциации пептидного антигена и молекулы MHC, например, обычно с помощью нековалентных взаимодействий пептида в связывающей бороздке или углублении молекулы MHC. В некоторых вариантах осуществления комплекс MHC-пептид присутствует или представлен на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления комплекс MHC-пептид может специфически распознаваться рецептором антигена, таким как TCR, CAR типа TCR или его антигенсвязывающие части.

[0666] В некоторых вариантах осуществления пептид, такой как пептидный антиген или эпитоп, полипептида может ассоциироваться с молекулой MHC, например, для распознавания рецептором антигена. Как правило, пептид получается из фрагмента более длинной биологической молекулы, такой как полипептид или белок, или на его основе. В некоторых вариантах осуществления длина пептида, как правило, составляет от приблизительно 8 до приблизительно 24 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина пептида составляет или составляет приблизительно от 9 до 22 аминокислот для распознавания в комплексе MHC класса II. В некоторых вариантах осуществления длина пептида составляет или составляет приблизительно от 8 до 13 аминокислот для распознавания в комплексе MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления после распознавания пептида в связи с молекулой MHC, например, комплекса MHC-пептид, рецептор антигена, такой как TCR или CAR типа TCR, генерирует или запускает сигнал активации Т-клетки, который индуцирует Т-клеточную реакцию, такую как пролиферация Т-клеток, продукция цитокинов, цитотоксическая Т-клеточная реакция или другая ответная реакция.

[0667] В некоторых вариантах осуществления TCR-подобное антитело или его антигенсвязывающая часть известны или могут быть получены известными способами (смотрите, например, опубликованные заявки США US 2002/0150914; US 2003/0223994;

US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US 2009/0226474; US 2009/0304679; и публикацию международной заявки PCT WO 03/068201).

[0668] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающую часть, которая специфически связывается с комплексом МНС-пептид, можно получить путем иммунизации хозяина эффективным количеством иммуногена, содержащего специфический комплекс МНС-пептид. В некоторых случаях пептид комплекса МНС-пептид представляет собой антигенную детерминанту, способную связываться с МНС, такую как опухолевый антиген, например универсальный опухолевый антиген, миеломный антиген или другой антиген, описанный ниже. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество иммуногена затем вводят хозяину для вызова иммунного ответа, причем иммуноген сохраняет свою трехмерную форму в течение периода времени, достаточного для вызова иммунного ответа против трехмерной презентации пептида в связывающей бороздке молекулы МНС. Сыворотку, собранную у хозяина, затем анализируют для определения, продуцируются ли желательные антитела, которые распознают трехмерную презентацию пептида в связывающей бороздке молекулы МНС. В некоторых вариантах осуществления продуцированные антитела могут быть оценены для подтверждения того, что антитело может отличить комплекс МНС-пептид от только молекулы МНС, только представляющего интерес пептида и комплекса МНС и нерелевантного пептида. Желательные антитела затем могут быть выделены.

[0669] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающую часть, которая специфически связывается с комплексом МНС-пептид, можно получить с использованием методов дисплея библиотеки антител, такой как библиотеки антител в фагах. В некоторых вариантах осуществления могут быть сконструированы библиотеки фагового дисплея мутантных форм Fab, scFv или других форм антител, например, в которых члены библиотеки мутированы в одном или более остатков одного или более CDR (см., например, заявки США US 2002/0150914, US 2014/0294841; и Cohen CJ. et al. (2003) J Mol. Recogn. 16:324-332).

[0670] Термин «антитело» используется здесь в самом широком смысле, и антитело включает поликлональные и моноклональные антитела, в том числе интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая антигенсвязывающие (Fab)-фрагмент, $F(ab')_2$-фрагменты, Fab'-фрагменты, Fv-фрагменты, фрагменты рекомбинантного IgG (rIgG), вариабельные области тяжелой цепи (V_H), способные специфически связывать антиген, одноцепочечные фрагменты антител, включая одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv) и фрагменты в виде однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, нанотело). Термин охватывает генно-инженерные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгатные антитела, полиспецифические, например биспецифические, антитела, диатела, триатела и тетратела, тандем ди-scFv,

тандем три-scFv. Кроме особо оговоренных случаев, следует понимать, что термин «антитело» охватывает его функциональные фрагменты. Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD.

[0671] Термины «определяющая комплементарность область/участок» и «CDR» являются синонимами по отношению к терминам «гипервариабельная область/участок» и «HVR», и, как известно в данной области, они относятся к не-непрерывным последовательностям аминокислот в вариабельных областях антитела, которые обеспечивают антигенспецифичность и/или аффинность связывания. В целом, имеются три CDR в каждой вариабельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Терммины «каркасные области» и «FR» известны в данной области и они относятся к части, не относящейся к CDR, вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. В целом, в каждой полноразмерной вариабельной области тяжелой цепи имеется четыре FR (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4), и в каждой полноразмерной вариабельной области легкой цепи имеется четыре FR (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4).

[0672] Точные границы аминокислотной последовательности CDR или FR могут быть легко определены с использованием любой из хорошо известных систем нумерации, включая те, которые описаны в Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (нумерация по “Kabat”); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (нумерация по “Chothia”); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), “Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography,” J. Mol. Biol. 262, 732-745” (нумерация по “Contact”); 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 (нумерация по “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, (нумерация по “Aho”); и Martin et al., “Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm,” PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (нумерация по “AbM”).

[0673] Границы CDR или FR могут варьироваться в зависимости от используемой для идентификации системы нумерации. Например, нумерация по Kabat основана на структурных выравниваниях, в то время как нумерация по Chothia основана на структурной информации. Нумерация по Kabat и Chothia основана на наиболее распространенных длинах последовательностей областей антитела с инсерциями, где инсерции обозначаются с буквенным индексом, например, как «30a», и с делециями, возникающими в некоторых антителах. В этих двух системах нумерации одинаковые инсерции и делеции обозначены различными положениями, что приводит к различиям в нумерации остатков. Нумерация по Contact основана на анализе сложных кристаллических структур и во многих отношениях подобна нумерации по Chothia.

Нумерация по AbM представляет собой компромисс между нумерациями по Kabat и Chothia, и она что используется в программном обеспечении по моделированию антител Oxford Molecular's AbM.

[0674] Таблица 1, приведенная ниже, иллюстрирует примерные границы положений CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, идентифицируемые соответственно по нумерации Kabat, Chothia, AbM и Contct. Для CDR-H1 нумерация остатков указаны с использованием нумерации Kabat и Chothia. FR, расположенные между CDR, например, FR-L1 между CDR-L1 и CDR-L2, FR-L3между CDR-L2 и CDR-L3, и т.д. Следует отметить, что поскольку в соответствии с нумерацией по Kabat инсерции указаны в положениях H35A и H35B, конец петли CDR-H1 по Chothia, при нумерации по Kabat варьирует между H32 и H34 в зависимости от длины петли.

Таблица 1. Границы CDR по различным системам нумерации.

CDR	**Kabat**	**Chothia**	**AbM**	**Contact**
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 по Kabat[1])	H31--H35B	H26--H32.34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (нумерация по Chothia[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

[0675] Таким образом, если не указано иное, «определяющая комплементарность область», или CDR, отдельные конкретные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) данного антитела или его частей, такие как вариабельная область, охватывают (или конкретизируют) комплементарную область, представленную по любой из вышеуказанных систем нумерации, или других известные систем. Например, если указано, что конкретная CDR (например, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в данной аминокислотной последовательности VH- или VL-области, то следует понимать, что такая CDR имеет последовательность соответствующих CDR (например, CDR-H3) в вариабельной области, как определено с помощью любой из вышеуказанных систем нумерации, или других известных систем. В некоторых вариантах осуществления указаны конкретные последовательности CDR. Примеры последовательностей CDR антител описаны с использованием различных систем нумерации, хотя понятно, что антитело может включать CDR, описанную с

помощью любой другой системы нумерации из числа указанных выше, или с помощью любой другой системы нумерации, которые известны специалисту в данной области.

[0676] Аналогичным образом, если не указано иное, следует понимать, что FR или конкретные FR (например, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4) в данном антителе или его областях, таких как вариабельная область, охватывают (или конкретизируют) каркасную область, представленную по любой из известных систем нумерации. В некоторых случаях представлена нумерация для идентификации конкретных CDR или FR, таких как CDR по Kabat, Chothia, AbM или Contact, или по другим известным системам. В других случаях представлена конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

[0677] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты специфически распознают антиген полноразмерного антитела. В некоторых вариантах осуществления тяжелая и легкая цепи антитела могут быть полноразмерными или могут представлять собой антигенсвязывающую часть (Fab, $F(ab')_2$, Fv или одноцепочечный Fv-фрагмент (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, конкретнее, IgG1 (например, IgG1 человека). В другом варианте осуществления константная область легкой цепи антитела выбрана, например, из каппа или лямбда, в частности из каппа.

[0678] Среди предоставленных антител имеются фрагменты антител. «Фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая включает часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается встречающееся в природе антитело. Примеры фрагментов антител включают, но без ограничения ими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; диатела; линейные антитела; вариабельные области тяжелой цепи (V_H), одноцепочечные молекулы антител, такие как scFv и антитела с одним доменом V_H; и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В конкретных вариантах осуществления антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, включающие вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи, такие как scFv.

[0679] Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL, соответственно) встречающегося в природе антитела, как правило, имеют сходные структуры, причем каждый домен включает четыре консервативных каркасных области (FR) и три CDR (см., например, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)). Один VH- или VL-домен может быть достаточным для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают определенный антиген, могут быть выделены с использованием VH- или VL-домена антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных VH- или VL-доменов,

соответственно (см., например, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)).

[0680] Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, включающие весь или часть вариабельного домена тяжелой цепи или весь или часть вариабельного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления однодоменным антителом является однодоменное антитело человека. В некоторых вариантах осуществления CAR включает домен тяжелой цепи антитела, который специфически связывает антиген, такой как раковый маркер или антиген клеточной поверхности клетки или заболевания, на которое нужно воздействовать, такой как опухолевая клетка или раковая клетка, например любой из описанных здесь или известных в данной области техники антигенов-мишеней.

[0681] Фрагменты антител могут быть получены различными способами, включая, но без ограничения, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой полученные рекомбинантным путем фрагменты, такие как фрагменты с компоновками, 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 могут не создаваться путем ферментативного расщепления встречающегося в природе интактного антитела. В некоторых вариантах осуществления фрагменты антител представляют собой scFv.

[0682] «Гуманизированное» антитело представляет собой антитело, в котором все или по существу все аминокислотные остатки CDR происходят из нечеловеческих CDR, а все или по существу все аминокислотные остатки FR происходят из человеческих FR. Гуманизированное антитело необязательно может включать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящей из антитела человека. «Гуманизированная форма» нечеловеческого антитела относится к варианту нечеловеческого антитела, которое было подвергнуто гуманизации, обычно для снижения иммуногенности для людей, сохраняя при этом специфичность и аффинность родительского нечеловеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR в гуманизированном антителе замещены соответствующими остатками нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого происходят остатки CDR), например, для восстановления или увеличения специфичности или аффинности антитела.

[0683] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена, включая CAR типа TCR, включает экстраклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент включает scFv. В некоторых аспектах химерный рецептор антигена включает экстраклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, 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 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, включающий мотив активации иммунорецепторов на основе тирозина (ITAM).

[0684] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный рецептор, такой как CAR, например, его антительнвя часть, дополнительно включает спейсер, который может представлять собой или включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина или ее вариант или модифицированный вариант, такой как шарнирная область, например шарнирная область IgG4, и/или CH1/CL- и/или Fc-область. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор включает, кроме того, спейсер и/или шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления константная область или часть представляет собой таковую IgG человека, например IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах часть константной области служит в качестве спейсерной области между антиген-распознающим компонентом, например, scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, которая обеспечивает повышенную реактивность клетки после связывания антигена, по сравнению с отсутствием спейсера.

[0685] В некоторых примерах длина спейсера составляет или приблизительно составляет 12 аминокислот или не более 12 аминокислот. Приводимые в качестве примера спейсеры включают те, 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, включая любое целое число между конечными точками любого из перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления спейсерная область содержит приблизительно 12 аминокислот или менее, приблизительно 119 аминокислот или менее или приблизительно 229 аминокислот или менее. Приводимые в качестве примера спейсеры включают только шарнирную область IgG4, шарнирную область IgG4, связанную с CH2- и CH3-доменами, или шарнирную область IgG4, связанную с доменом CH3-доменом. Приводимые в качестве примера спейсеры включают, но без ограничения, те, которые описаны в Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19: 3153 или в международной заявке WO 2014/031687, в патенте США US 822647 или в опубликованной заявке США US 2014/0271635. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает последовательность шарнирной области иммуноглобулина, в частности, области CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из шарнира, CH2 и CH3 происходят полностью или частично из IgG4 или IgG2. В некоторых случаях шарнир, CH2 и CH3 происходят из IgG4. В некоторых аспектах один или

несколько из шарнира, CH2 и CH3 являются химерными и содержат последовательность, полученную из IgG4 и IgG2. В некоторых примерах спейсер содержит химерный шарнир IgG4/2, CH2-область IgG2/4 и CH3-область IgG4.

[0686] В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер может происходить целиком или частично из IgG4 и/или IgG2, и может включать мутации, такие как одна или несколько мутаций одной аминокислоты в одном или нескольких доменах. В некоторых примерах аминокислотная модификация представляет собой замену пролина (P) на серин (S) в шарнирной области IgG4. В некоторых вариантах аминокислотная модификация представляет собой замену глутамина (Q) на аспарагин (N) для уменьшения неоднородности гликозилирования, такую как мутация N177Q в положении 177 в CH2-области полноразмерной Fc-последовательности IgG4 или N176Q в положении 176 в области CH2 полноразмерной Fc-последовательности IgG4.

[0687] В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер имеет последовательность ESKYGPPCPPCP (представленную в SEQ ID NO: 1) и кодируется последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления константная область или ее часть представляет собой IgD. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность аминокислот, которая по меньшей мере идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 или 29 по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

[0688] В некоторых вариантах осуществления изобретения константная область или ее часть представляет собой IgD. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность аминокислот, которая по меньшей мере идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 4 или 5 по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

[0689] Домен распознавания антигена обычно связан с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, такими как сигнальные компоненты, которые имитируют активацию посредством комплекса рецептор-антиген, такого как компдекс TCR, в случае CAR, и/или сигнала через другой рецептор клеточной поверхности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий компонент (например, антитело) связывается с одной или более трансмембранными и внутриклеточными сигнальными областями. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен слит с внеклеточным доменом. В одном варианте используется трансмембранный домен, который связан с одним из доменов в рецепторе, например, CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбирают или модифицируют

аминокислотным замещением, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами одного и того же или различных поверхностных мембранных белков для минимизации взаимодействий с другими членами рецепторного комплекса.

[0690] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен происходит из природного или синтетического источника. Если источник является природным, домен в некоторых аспектах происходит из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, происходящие 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. Альтернативно, 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 для фенилаланина, триптофана и валина будет обнаруживаться на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления связь осуществляется с помощью линкеров, спейсеров и/или трансмембранного домена(ов).

[0691] Среди внутриклеточных сигнальных доменов есть те, которые имитируют или аппроксимируют сигнал через природный рецептор антигена, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором и/или сигнал через один только 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 дублет глицин-серин, присутствует и образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

[0692] Рецептор, например CAR, обычно включает по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты. В некоторых вариантах осуществления рецептор включает внутриклеточный компонент TCR комплекса, такой как цепь CD3 TCR, которая опосредует активацию Т-клеток и цитотоксичность, например, дзета-цепь CD3. Таким образом, в некоторых аспектах ROR1-связывающее антитело связано с одним или более клеточных сигнальных модулей. В некоторых вариантах осуществления клеточные сигнальные модули включают трансмембранный домен CD3, внутриклеточные сигнальные домены CD3 и/или трансмембранные домены других CD. В некоторых вариантах осуществления рецептор, например CAR, включает, кроме того, часть одной или более дополнительных молекул, таких как Fc-рецептор ϒ, CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах CAR включает химерную молекулу между CD3-дзета (CD3-ζ) или Fc-рецептором ϒ и CD8, CD4, CD25 или CD16.

[0693] В некоторых вариантах осуществления изобретения после лигирования CAR цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен рецептора активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций или ответных

реакций иммунной клетки, например Т-клетки, сконструированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых случаях CAR индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическая активность или Т-хелперная активность, например, секрецию цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления вместо интактной иммуностимулирующей цепи используется, например, усеченная часть внутриклеточной сигнальной области компонента рецептора антигена или костимулирующей молекулы, если она передает сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен или домены включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), а в некоторых аспектах также последовательности корецепторов, которые в природном окружении действуют совместно с таким рецептором, чтобы инициировать преобразование сигнала после вхождения в контакт с рецептором антигена, и/или любое производное или вариант таких молекул, и/или любую синтетическую последовательность, которая обладает такой же функциональной способностью.

[0694] В случае природного TCR, для полной активации обычно требуется не только передача сигналов через TCR, но также и костимулирующий сигнал. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления для способствования полной активации в CAR также включен компонент для выдачи вторичного или костимулирующего сигнала. В других вариантах осуществления CAR не включает компонент для выдачи костимулирующего сигнала. В некоторых аспектах дополнительный CAR экспрессируется в той же клетке и обеспечивает компонент для выдачи вторичного или костимулирующего сигнала.

[0695] В некоторых аспектах активация Т-клеток описывается как опосредуемая двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антиген-зависимую первичную активацию через TCR (первичными цитоплазматическими сигнальными последовательностями), и теми, которые действуют антиген-независимым образом для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (вторичными цитоплазматическими сигнальными последовательностями). В некоторых аспектах CAR включает один или оба из таких сигнальных компонентов.

[0696] В некоторых аспектах CAR включает первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует первичную активацию TCR комплекса. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как мотивы активации иммунорецепторов на основе тирозина или ITAM. Примеры ITAM-содержащих первичных цитоплазматических сигнальных последовательностей включают последовательности, происходящие из TCR или CD3 дзета, FcR гамма или FcR бета. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматическая сигнальная молекула(ы) в CAR содержит цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, происходящую из CD3 дзета.

[0697] В некоторых вариантах осуществления CAR включает сигнальную область и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такой как CD28, 4-IBB, OX40, DAP10 и ICOS. В некоторых аспектах один и тот же CAR включает как сигнальную область, так и костимулирующие компоненты.

[0698] В некоторых вариантах осуществления сигнальная область и/или активирующий домен включены в один CAR, тогда как костимулирующий компонент обеспечивается другим CAR, распознающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления CAR включают активирующие или стимулирующие CAR и костимулирующие CAR, оба экспрессируемые в одной и той же клетке (см. WO 2014/055668).

[0699] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область содержит трансмембранный и сигнальный домен CD28, связанный с внутриклеточным доменом CD3 (например, CD3-дзета). В некоторых вариантах внутриклеточная сигнальная область содержит химерные CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9) костимулирующие домены, связанные с внутриклеточным доменом CD3 дзета.

[0700] В некоторых вариантах осуществления CAR включает один или более, например два или более костимулирующих доменов и домен активации, например домен первичной активации, в цитоплазматической части. Приводимые в качестве примера CAR включают внутриклеточные компоненты CD3-дзета, CD28 и 4-IBB.

[0701] В некоторых случаях CAR называются CAR первого, второго и/или третьего поколения. В некоторых аспектах CAR первого поколения представляет собой тот, который обеспечивает только сигнал, индуцированный цепью CD3 при связывании антигена; в некоторых аспектах CAR второго поколения представляют собой тот, который обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, например тот, который включает внутриклеточный сигнальный домен от костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах CAR третьего поколения представляет собой тот, который включает множество костимулирующих доменов различных костимулирующих рецепторов.

[0702] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный рецептор антигена включает экстраклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, описанный здесь. В некоторых аспектах химерный рецептор антигена включает экстраклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, описанный здесь, и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент включает scFv или антитело с одним доменом VH, а внутриклеточный домен содержит ITAM. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен включает сигнальный домен дзета-цепи CD3-дзета (CD3ζ). В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена включает трансмембранный домен, расположенный между экстраклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

[0703] В некоторых аспектах трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. Экстраклеточный домен и трансмембранный домен могут быть связаны прямо или косвенно. В некоторых вариантах осуществления экстраклеточный домен и трансмембранный домен связаны спейсером, таким как любой, описанный здесь. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы Т-клеток, например, между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых аспектах костимулирующая молекула Т-клеток представляет собой CD28 или 4-1BB.

[0704] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который является или содержит трансмембранную часть CD28 или его функционального варианта, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть CD28 или его функционального варианта и сигнальную часть CD3-дзета или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который является или содержит трансмембранную часть CD28 или его функционального варианта, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть 4-IBB или его функционального варианта и сигнальную часть CD3-дзета или его функционального варианта. В некоторых таких вариантах осуществления рецептор включает, кроме того, спейсер, содержащий часть молекулы Ig, такой как молекула Ig человека, такую как шарнирная область Ig, например шарнирная область IgG4, например спейсер в виде только шарнирной области.

[0705] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен рецептора, например CAR, представляет собой трансмембранный домен CD28 человека или его варианта, например 27-аминокислотный трансмембранный домен CD28 человека (№ доступа: P10747.1), или представляет собой трансмембранный домен, который включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая идентична по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более последовательности с SEQ ID NO: 8; в некоторых вариантах осуществления часть рекомбинантного рецептора, содержащая трансмембранный домен, включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, идентичную ей на по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

[0706] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный рецептор антигена содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы Т-клеток. В некоторых аспектах костимулирующая молекула Т-клеток представляет собой CD28 или 4-1BB.

[0707] В некоторых вариантах осуществления изобретения внутриклеточная сигнальная область включает внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека или его функциональный вариант или часть, например его 41-

аминокислотный домен и/или такой же домен встречающегося в природе белка CD28c заменой LL на GG в положениях 186-187. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен может включать последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 10 или 11, или последовательность аминокислот, которая идентична последовательности SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная область включает внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-IBB или его функциональный вариант или часть, например 42-аминокислотный цитоплазматический домен 4-IBB человека (№ доступа Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, например последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 12, или последовательность аминокислот, которая идентична последовательности с SEQ ID NO: 12 по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

[0708] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область включает цепь CD3 человека, необязательно стимулирующий сигнальный домен CD3 дзета или его функциональный вариант, такой как 112-аминокислотный цитоплазматический домен изоформы 3 CD3ζ человека (номер доступа: P20963.2) или сигнальный домен CD3 дзета, описанный в патенте США US 7446190 или патенте США US 8911993. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область включает последовательность аминокислот, определенную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или последовательность аминокислот, которая идентична последовательности с SEQ ID NO: 13, 14 или 15по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

[0709] В некоторых аспектах спейсер содержит только шарнирную область IgG, например только шарнирную область IgG4 или IgG1, например спейсер в виде шарнирной области, определенной в SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления спейсер представляет собой шарнирную область Ig, например шарнирную область IgG4, связанную с CH2- и/или CH3-доменами. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой шарнирную область Ig, например шарнирную область IgG4, связанную с CH2- и CH3-доменами, например, как определено в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой шарнирную область Ig, например шарнирную область IgG4, связанную только с CH3-доменом, например, как определено в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой или включает последовательность, богатую глицином и серином, или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры.

2. Т-клеточные рецепторы (TCR)

[0710] В некоторых вариантах осуществления изобретения представлены сконструированные клетки, такие как Т-клетки, которые экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающую часть, которая распознает пептидный

эпитоп или Т-клеточный эпитоп полипептида-мишени, такого как опухолевый антиген, вирусный или аутоиммунный белок.

[0711] В некоторых вариантах осуществления «Т-клеточный рецептор» или «TCR» представляет собой молекулу, которая содержит вариабельные α и β цепи (также известные как TCRα и TCRβ, соответственно) или вариабельные ϒ и δ цепи (также известные как TCRϒ и TCRδ, соответственно) или их антигенсвязывающие части, и которая способна к специфическому связыванию с пептидом, связанным с молекулой MHC. В некоторых вариантах осуществления TCR находится в αβ форме. Как правило, TCR, которые существуют в αβ и ϒδ формах, обычно структурно сходны, но экспрессирующие их Т-клетки могут иметь различные анатомические положения или функции. TCR можно найти на поверхности клетки или в растворимой форме. Как правило, TCR обнаруживается на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он обычно отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC).

[0712] Если не указано иное, следует понимать, что термин «TCR» охватывает полноразмерные TCR, а также их антигенсвязывающие части или антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой интактный или полноразмерный TCR, включая TCR в αβ форме или в ϒδ форме. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой антигенсвязывающую часть, которая меньше полноразмерного TCR, но которая связывается со специфическим пептидом, связанным с молекулой MHC, например, связывается с комплексом MHC-пептид. В некоторых случаях антигенсвязывающая часть или фрагмент TCR может содержать только часть структурных доменов полноразмерного или интактного TCR, но все же способна связывать пептидный эпитоп, такой как комплекс MHC-пептид, с который связывается полноразмерный TCR. В некоторых случаях антигенсвязывающая часть содержит вариабельные домены TCR, такие как вариабельная цепь α и вариабельная цепь β TCR, достаточные для образования сайта связывания для связывания со специфическим комплексом MHC-пептид. Как правило, вариабельные цепи TCR содержат определяющие комплементарность участки, участвующие в распознавании пептида, MHC и/или комплекса MHC-пептид.

[0713] В некоторых вариантах осуществления вариабельные домены TCR содержат гипервариабельные петлевые участки или определяющие комплементарность участки (CDR), которые, как правило, являются основными вкладчиками в способность к распознаванию и связыванию антигена и специфичность. В некоторых вариантах осуществления CDR TCR или их комбинации образуют весь или по существу весь антигенсвязывающий сайт данной молекулы TCR. Различные CDR в вариабельной области цепи TCR обычно разделяются каркасными областями (FR), которые обычно демонстрируют меньшую вариабельность среди молекул TCR по сравнению с CDR (см., например, Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988; смотрите также Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). В некоторых

вариантах осуществления CDR3 является основным CDR, ответственным за связывание или специфичность к антигену, или является самым важным среди трех CDR в данной вариабельной области TCR для распознавания антигена и/или для взаимодействия с процессированной пептидной частью комплекса пептид-MHC. В некоторых случаях CDR1 альфа-цепи может взаимодействовать с N-концевой частью определенных антигенных пептидов. В некоторых случаях CDR1 бета-цепи может взаимодействовать с С-концевой частью пептида. В некоторых случаях CDR2 вносит самый большой вклад или является основным CDR, ответственным за взаимодействие или распознавание MHC-части комплекса MHC-пептид. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область ?-цепи может содержать дополнительный гипервариабельный участок (CDR4 или HVR4), который обычно участвует в связывании с суперантигеном, а не в распознавании антигена (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

[0714] В некоторых вариантах осуществления TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический хвост (см., например, Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). В некоторых аспектах каждая цепь TCR может иметь один N-концевой вариабельный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост на С-конце. В некоторых вариантах осуществления TCR связан с инвариантными белками комплекса CD3, участвующими в трансдукции сигнала.

[0715] В некоторых вариантах осуществления цепь TCR содержит один или более константных доменов. Например, экстраклеточная часть конкретной цепи TCR (например, α-цепи или β-цепи) может содержать два иммуноглобулиноподобных домена, таких как вариабельный домен (например, Vα или Vβ; обычно аминокислоты с 1 по 116 на основе нумерации по Kabat (Kabat et al., “Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.) и константный домен (например, константный домен α-цепи или Cα, как правило, в положениях 117-259 цепи на основе нумерации по Kabat) или константный домен β-цепи или Cβ, как правило, в положениях 117-295 цепи на основе нумерации по Kabat) рядом с клеточной мембраной. Например, в некоторых случаях экстраклеточная (внеклеточная) часть TCR, образованного двумя цепями, содержит два мембранно-проксимальных константных домена и два мембранно-дистальных вариабельных домена, при этом каждый вариабельный домен содержит CDR. Константный домен TCR может содержать короткие соединительные последовательности, в которых остаток цистеина образует дисульфидную связь, тем самым связывая две цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR может иметь дополнительный остаток цистеина в каждой из α и β цепей; так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

[0716] В некоторых вариантах осуществления цепи TCR содержат трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является положительно заряженным. В некоторых случаях цепь TCR содержит

цитоплазматический хвост. В некоторых случаях структура позволяет TCR связываться с другими молекулами типа CD3 и его субъединицами. 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 CD3Ɣ, CD3δ, CD3ε и CD3ζ) содержат один или более мотивов активации иммунорецепторов на основе тирозина или ITAM, которые участвуют в способности TCR комплекса к передаче сигналов.

[0717] В некоторых вариантах осуществления TCR может представлять собой гетеродимер с двумя α и β цепями (или необязательно Ɣ и δ), или он может представлять собой одноцепочечную конструкцию TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (α и β цепи или Ɣ и δ цепи), которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями.

[0718] В некоторых вариантах осуществления TCR может быть получен исходя из известной последовательности(ей) TCR, такой как последовательности Vα,β цепей, для которых легкодоступна по существу полноразмерная кодирующая последовательность. Способы получения полноразмерных последовательностей TCR, включая последовательности V-цепей, из клеточных источников хорошо известны. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, могут быть получены из ряда источников, например, путем амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) кодирующих TCR нуклеиновых кислот внутри данной клетки или клеток или выделенных из них, или синтеза общедоступных ДНК-последовательностей TCR.

[0719] В некоторых вариантах осуществления TCR получают из биологического источника, такого как клетки, такие как Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), Т-клеточные гибридомы или другие общедоступные источники. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из выделенных in vivo клеток. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой тимически отобранный TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой TCR с рестрикцией по неоэпитопу. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут представлять собой культивируемую Т-клеточную гибридому или клон. В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть синтезированы, исходя из знания последовательности TCR.

[0720] В некоторых вариантах осуществления изобретения TCR конструируют исходя из TCR, идентифицированного или отобранного при скрининге библиотеки TCR-кандидатов против полипептидного антигена-мишени или его Т-клеточного эпитопа-мишени. Библиотеки TCR могут быть сконструированы путем амплификации репертуара Vα или Vβ из Т-клеток, выделенных от субъекта, включая клетки, присутствующие в PBMC, селезенке или другом лимфоидном органе. В некоторых случаях Т-клетки могут быть амплифицированы из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). В некоторых вариантах осуществления библиотеки TCR могут быть получены из CD4+ или CD8+ Т-

клеток. В некоторых вариантах осуществления TCR можно амплифицировать из источника Т-клеток нормального здорового субъекта, т.е. библиотек нормальных TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR можно амплифицировать из источника Т-клеток пораженного болезнью субъекта, т.е. библиотек пораженных болезнью TCR. В некоторых вариантах осуществления вырожденные праймеры используются для амплификации репертуара генов Vα или Vβ, например, с помощью ОТ-ПЦР в образцах, таких как Т-клетки, полученных от людей. В некоторых вариантах осуществления библиотеки scTv могут быть собраны из библиотек «необученных» Vα или Vβ, в которых амплифицированные продукты клонируются или собираются с разделением линкером. В зависимости от источника субъекта и клеток, библиотеки могут быть специфическими для аллели HLA. Альтернативно, 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 изменяют конкретные остатки в CDR TCR. 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 CTL против пептида. В некоторых аспектах TCR, например, присутствующие в антигенспецифических Т-клетках, могут быть отобраны, например, по активности связывания, например, определенной аффинности или авидности к антигену.

[0721] В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные антигенные рецепторы включают рекомбинантные Т-клеточные рецепторы (TCR) и/или TCR, клонированные из встречающихся в естественных условиях Т-клеток. В некоторых вариантах выполнения высокоаффинный Т-клеточный клон для целевого антигена (например, ракового антигена) идентифицируют, выделяют из пациента и вводят в клетки. В некоторых вариантах клон TCR для целевого антигена формируют в трансгенных мышах, сконструированных с генами иммунной системы человека (например, системы человеческого лейкоцитарного антигена 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. 175:5799-580). В некоторых вариантах осуществления для выделения TCR против антигена-мишени используют фаговый дисплей (см. например, Vaella-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390-1395 и Li (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354).

[0722] В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть является таковой, которая была модифицирована или сконструирована. В некоторых вариантах осуществления способы направленной эволюции используются для создания TCR с измененными свойствами, такими как более высокое сродство к конкретному комплексу MHC-пептид. В некоторых вариантах осуществления направленная эволюция достигается с использованием способов дисплея, в том числе, но без ограничения, дрожжевого дисплея (Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc Natl

Acad Sci USA, 97, 5387-92), фагового дисплея (Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54) или Т-клеточного дисплея (Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84). В некоторых вариантах осуществления подходы к дисплею включают конструирование или модификацию известного, родительского или ссылочного TCR. Например, в некоторых случаях TCR дикого типа может использоваться в качестве матрицы для получения подвергнутых мутагенезу TCR, в которых один или более остатков CDR мутированы, и отбираются мутанты с желательным измененным свойством, таким как более высокое сродство к желательному антигену-мишени.

[0723] В некоторых вариантах осуществления пептиды полипептида-мишени для использования при получении или конструировании представляющего интерес TCR известны или могут быть без труда идентифицированы. В некоторых вариантах осуществления пептиды, подходящие для использования в конструировании TCR или антигенсвязывающих частей, могут быть определены на основе присутствия мотива с рестрикцией по HLA в представляющем интерес полипептиде-мишени, таком как полипептид-мишень, описанный ниже. В некоторых вариантах осуществления пептиды идентифицируют с использованием доступных компьютерных моделей прогнозирования. В некоторых вариантах осуществления для прогнозирования сайтов связывания MHC класса I такие модели включают, но без ограничения ими, ProPredl (Singh and Raghava (2001) Bioinformatics 17 (12):1236-1237 и SYFPEITHI (смотрите Schuler et al. (2007) Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, 409(1):75-93 2007). В некоторых вариантах осуществления MHC-рестриктированный эпитоп представляет собой HLA-A0201, который экспрессируется приблизительно у 39-46% всех представителей белой европеоидной расы и, следовательно, представляет собой подходящий выбор антигена MHC для использования при получении TCR или другой молекулы, связывающей MHC-пептид.

[0724] HLA-A0201-связывающие мотивы и сайты расщепления для протеасом и иммунных протеасом известны в связи с использованием компьютерных моделей прогнозирования. Для прогнозирования сайтов связывания MHC класса I, такие модели включают, но без ограничения, ProPredl (более подробно описанная в 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).

[0725] В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть могут представлять собой рекомбинантно продуцируемый природный белок или его мутированную форму, в которой было изменено одно или более свойств, например характеристика связывания. В некоторых вариантах осуществления TCR может происходить от одного из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса или другое млекопитающее. TCR может быть связанным с клеткой или в растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления для целей предоставленных способов TCR находится в связанной с клеткой форме, экспрессируемой на поверхности клетки.

[0726] В некоторых вариантах осуществления TCR является полноразмерным TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой димерный TCR (dTCR). В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой одноцепочечный TCR (sc-TCR). В некоторых вариантах осуществления dTCR или scTCR имеют структуры, описанные в WO 03/020763, WO 04/033685 и WO 2011/044186.

[0727] В некоторых вариантах осуществления TCR содержит последовательность, соответствующую трансмембранной последовательности. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит последовательность, соответствующую цитоплазматическим последовательностям. В некоторых вариантах осуществления TCR способен образовывать комплекс TCR с CD3. В некоторых вариантах осуществления любой из TCR, включая 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.

[0728] В некоторых вариантах осуществления dTCR содержит первый полипептид, в котором последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области α-цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей экстраклеточной последовательности константной области α-цепи TCR, и второй полипептид, в котором последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области β-цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей экстраклеточной последовательности константной области β-цепи TCR, при этом первый и второй полипептиды связаны дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления связь может соответствовать встречающейся в природе межцепочечной дисульфидной связи, присутствующей во встречающихся в природе димерных αβ TCR. В некоторых вариантах осуществления межцепочечные дисульфидные связи не присутствуют во встречающемся в природе TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления один или более цистеинов могут быть включены в экстраклеточные последовательности константной области пары полипептидов dTCR. В некоторых случаях может быть желательной как встречающаяся в природе, так и не встречающаяся в природе дисульфидная связь. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит трансмембранную последовательность для закрепления в мембране.

[0729] В некоторых вариантах осуществления dTCR содержит α-цепь TCR, содержащую вариабельный α-домен, константный α-домен и первый мотив димеризации, присоединенный к С-концу константного α-домена, и β-цепь TCR, содержащую вариабельный β-домен, константный β-домен и второй мотив димеризации, присоединенный к С-концу константного β-домена, причем первый и второй мотивы димеризации легко взаимодействуют с образованием ковалентной связи между аминокислотой в первом мотиве димеризации и аминокислотой во втором мотиве димеризации, связывая вместе α-цепь TCR и β-цепь TCR.

[0730] В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой scTCR. Как правило, scTCR может быть сконструирован с использованием известных методов (см., например, Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. and Plückthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (USA) 90 3830 (1993); международные заявки WO 96/13593, WO 96/18105, WO 99/60120, WO 99/18129, WO 03/020763, WO 2011/044186; и Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996)). В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит введенную не встречающуюся в природе дисульфидную межцепочечную связь для облегчения ассоциации цепей TCR (см., например, международную заявку WO 03/020763). В некоторых вариантах осуществления scTCR представляет собой усеченный TCR с недисульфидной связью, в котором гетерологичные лейциновые молнии, слитые с их С-концами, облегчают ассоциацию цепей (см., например, международную заявку WO 99/60120). В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит вариабельный домен TCRα, ковалентно связанный с вариабельным доменом TCRβ через пептидный линкер (см., например, международную заявку WO 99/18129).

[0731] В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит первый сегмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей вариабельной области α-цепи TCR, второй сегмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей последовательности вариабельной области β-цепи TCR, слитый с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей экстраклеточной последовательности константного домена β-цепи TCR, и линкерную последовательность, связывающую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

[0732] В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности вариабельной области α-цепи, слитый с N-концом экстраклеточной последовательности константного домена α-цепи, и второй сегмент, состоящий из последовательности вариабельной области β-цепи, слитый с N-концом экстраклеточной константной и трансмембранной последовательности β-цепи, и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

[0733] В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности вариабельной области β-цепи TCR, слитой с N-концом экстраклеточной последовательности константной области β-цепи, и второй сегмент, состоящий из последовательности вариабельной области α-цепи, слитый с N-концом экстраклеточной константной и трансмембранной последовательности α-цепи, и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

[0734] В некоторых вариантах осуществления линкер scTCR, который связывает первый и второй сегменты TCR, может представлять собой любой линкер, способный образовывать одну полипептидную цепь, сохраняя при этом специфичность связывания TCR. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность может,

например, иметь формулу -P-AA-P-, где P представляет собой пролин, а AA представляет собой аминокислотную последовательность, в которой аминокислоты представляют собой глицин и серин. В некоторых вариантах осуществления первый и второй сегменты спарены так, что последовательности их вариабельных областей ориентированы для такого связывания. Следовательно, в некоторых случаях линкер имеет достаточную длину, чтобы охватить расстояние между C-концом первого сегмента и N-концом второго сегмента, или наоборот, но он не является слишком длинным, чтобы блокировать или уменьшать связывание scTCR с лигандом-мишенью. В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать от или приблизительно от 10 до 45 аминокислот, например от 10 до 30 аминокислот или от 26 до 41 аминокислотных остатков, например 29, 30, 31 или 32 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет формулу -PGGG-(SGGGG)5-P-, где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин, и S представляет собой серин (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления линкер имеет последовательность GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO: 23).

[0735] В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, связывающую остаток иммуноглобулинной области константного домена α-цепи с остатком иммуноглобулинной области константного домена β-цепи. В некоторых вариантах осуществления межцепочечная дисульфидная связь в природном TCR отсутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления один или более цистеинов могут быть включены в экстраклеточные последовательности константных областей первого и второго сегментов полипептида scTCR. В некоторых случаях может быть желательной как встречающаяся в природе, так и не встречающаяся в природе дисульфидная связь.

[0736] В некоторых вариантах осуществления dTCR или scTCR, содержащих введенные межцепочечные дисульфидные связи, встречающиеся в природе дисульфидные связи, отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления один или более природных цистеинов, образующих встречающиеся в природе межцепочечные дисульфидные связи, замещены другим остатком, таким как серин или аланин. В некоторых вариантах осуществления введенная дисульфидная связь может быть образована путем мутации нецистеиновых остатков в первом и втором сегментах с заменой на цистеин. Приводимые в качестве примера не встречающиеся в природе дисульфидные связи TCR описаны в международной заявке WO 2006/000830.

[0737] В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающий фрагмент проявляют сродство с константой равновесного связывания для антигена-мишени между или приблизительно между 10^{-5} и 10^{-12} M и всеми отдельными значениями и диапазонами в них. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой комплекс MHC-пептид или лиганд.

[0738] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, например, α- и β-цепи, можно амплифицировать

с помощью ПЦР, клонирования или других подходящих способов и клонировать в подходящий экспрессионный вектор или векторы. Экспрессионный вектор может быть любым подходящим рекомбинантным экспрессионным вектором и может использоваться для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Подходящие векторы включают векторы, предназначенные для размножения и увеличения количества или для экспрессии или того и другого, такие как плазмиды и вирусы.

[0739] В некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой вектор из серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), серии pET (Novagen, Madison, WI), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Швеция) или серия pEX (Clontech, Palo Alto, CA). В некоторых случаях также могут использоваться векторы на основе бактериофагов, такие как λG10, λGT11, λZapII (Stratagene), λEMBL4 и λNM1149. В некоторых вариантах осуществления могут использоваться векторы для экспрессии в клетках растений, и они включают pBIO1, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В некоторых вариантах осуществления векторы для экспрессии в клетках животных включают pEUK-Cl, pMAM и pMAMneo (Clontech). В некоторых вариантах осуществления используется вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор.

[0740] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные экспрессионные векторы могут быть получены с использованием стандартных методов рекомбинантных ДНК. В некоторых вариантах осуществления векторы могут содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые специфичны для типа хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), в который должен быть введен вектор, как уместно и принимая во внимание, является ли вектор вектором на основе ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать не встречающийся в природе промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей TCR или его антигенсвязывающую часть (или другую связывающую MHC-пептид молекулу). В некоторых вариантах осуществления промотор может быть невирусным промотором или вирусным промотором, таким как промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор, обнаруживаемый в длинном концевом повторе вируса мышиных стволовых клеток. Также могут быть использованы и другие известные промоторы.

[0741] В некоторых вариантах осуществления изобретения после получения клона Т-клеток α- и β-цепи TCR выделяют и клонируют в вектор экспрессии гена. В некоторых вариантах осуществления гены α- и β-цепей TCR связаны через рибосомальным со скиповым пептидом пикорнавируса 2A, так что обе цепи коэкспрессируются. В некоторых вариантах осуществления генетическая передача TCR осуществляется посредством ретровирусных или лентивирусных векторов или через транспозоны (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).

[0742] В некоторых вариантах осуществления для создания вектора, кодирующего TCR, α- и β-цепи амплифицируют с помощью ПЦР исходя из тотальной кДНК, выделенной из клона Т-клеток, экспрессирующего представляющий интерес TCR, и клонируют в экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления α- и β-цепи клонируют в один и тот же вектор. В некоторых вариантах осуществления α- и β-цепи клонируют в разные векторы. В некоторых вариантах осуществления сконструированные α- и β-цепи включают в ретровирусный, например лентивирусный вектор.

3. Химерные рецепторы аутоантител (CAAR)

[0743] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор аутоантител (CAAR). В некоторых вариантах осуществления CAAR является специфическим для аутоантитела. В некоторых вариантах выполнения клетка, экспрессирующая CAAR, такой как Т-клетка, сконструированная для экспрессии CAAR, может быть использована для специфического связывания с клетками, экспрессирующими аутоантитело, и для уничтожения этих клеток, но не нормальных клеток, экспрессирующими антитело. В некоторых вариантах осуществления CAAR-экспрессирующие клетки могут использоваться для лечения аутоиммунного заболевания, связанного с экспрессией аутоантигенов, такого как аутоиммунные заболевания. В некоторых вариантах осуществления мишенью CAAR-экспрессирующих клеток могут являться В-клетки, которые в конечном итоге продуцируют аутоантитела и представляют 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 нацеливания и уничтожения патогенных В-клеток при аутоиммунных заболеваниях путем нацеливания на вызывающие заболевание В-клетки с использованием антигенспецифического химерного рецептора аутоантитела. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой CAAR, такой как любой, описанный в заявке на патент США US 2017/0051035.

[0744] В некоторых вариантах осуществления изобретения 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 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, включающий мотив активации иммунорецепторов на основе тирозина (ITAM). В некоторых вариантах осуществления

внутриклеточная сигнальная область включает вторичную или костимулирующую сигнальную область (вторичные внутриклеточные сигнальные области).

[0745] В некоторых вариантах осуществления изобретения домен, связывающий аутоантитело, включает аутоантиген или его фрагмент. Выбор аутоантигена может зависеть от типа аутоантитела, на которое он нацелен. Например, аутоантиген может быть выбран, потому что он распознает аутоантитело в клетке-мишени, такой как В-клетка, которая связана с конкретным болезненным состоянием, например аутоиммунным заболеванием, таким как аутоиммунное заболевание, опосредованное аутоантителами. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание включает пузырчатку обыкновенную (PV). Примеры аутоантигенов включают десмоглеин 1 (Dsg1) и Dsg3.

4. Множественное нацеливание

[0746] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки и способы включают стратегии множественного нацеливания, такие как экспрессия двух или более генетически сконструированных рецепторов на клетке, каждый из которых распознает один и тот же антиген и обычно включает другой внутриклеточный сигнальный компонент. Такие стратегии множественного нацеливания описаны, например, в международной заявке WO 2014/055668 A1 (в которой описываются комбинации активирующих и костимулирующих CAR, например, нацеливание на два разных антигена, присутствующих по отдельности вне мишени, например, на нормальных клетках, но присутствующих вместе только на клетках заболевания или состояния, подвергаемого лечению) и в Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (2013) (где описываются клетки, экспрессирующие активирующий и ингибирующий CAR, такие как клетки, в которых активирующий CAR связывается с одним антигеном, экспрессируемым как в нормальных или не пораженных болезнью клетках, так и в клетках заболевания или состояния, подвергаемого лечению, а ингибирующий CAR связывается с другим антигеном, экспрессируемым только на нормальных клетках или клетках, которые нежелательно подвергать воздействию).

[0747] Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения клетки включают рецептор, представляющий первый генно-инженерный рецептор антигена (например, CAR или TCR), который способен индуцировать активирующий или стимулирующий сигнал в клетке, как правило, при специфическом связывании с антигеном, распознаваемым первым рецептором, например первым антигеном. В некоторых вариантах осуществления клетка включает, кроме того, второй генно-инженерный рецептор антигена (например, CAR или TCR), например химерный костимулирующий рецептор, который способен индуцировать костимулирующий сигнал в иммунной клетке, как правило, при специфическом 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 отличными.

[0748] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй генно-инженерный рецептор антигена (например, CAR или TCR) способен индуцировать активирующий сигнал в клетке. В некоторых вариантах осуществления рецептор включает внутриклеточный сигнальный компонент, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы. В некоторых вариантах осуществления активация, индуцированная первым рецептором, включает преобразование сигнала или изменение экспрессии белка в клетке, что приводит к инициации иммунного ответа, например, фосфорилированию ITAM и/или инициации каскада преобразования сигнала, опосредуемого ITAM, образованию иммунологического синапса и/или кластеризации молекул вблизи связанного рецептора (например, CD4 или CD8 и т.д.), активации одного или более факторов транскрипции, таких как NF-kB и/или AP-1, и/или индукции экспрессии генов таких факторов, как цитокины, пролиферации и/или выживанию.

[0749] В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и/или второй рецептор включает внутриклеточные сигнальные домены или области костимулирующих рецепторов, таких как CD28, CD137 (4-1BB), OX40 и/или ICOS. В некоторых вариантах осуществления первый и второй рецепторы включают внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора, которые различны. В одном варианте осуществления первый рецептор содержит костимулирующую сигнальную область CD28, а второй рецептор содержит костимулирующую сигнальную область 4-1BB, или наоборот.

[0750] В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй рецептор включает как внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM, либо ITAM-подобные мотивы, и внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора.

[0751] В некоторых вариантах осуществления изобретения 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 сигналом, индуцированным в одной и той же клетке, является сигналом, который приводит к иммунному ответу, такому как устойчивый и длительный иммунный ответ, например, увеличенной экспрессии генов, секреции цитокинов и других факторов, и опосредованным Т-клетками эффекторным функциям, таким как уничтожение клеток.

[0752] В некоторых вариантах осуществления изобретения ни лигирование только первого рецептора, ни лигирование только второго рецептора не индуцирует стойкий иммунный ответ. В некоторых аспектах, при лигировании только одного рецептора, клетка становится толерантной или не реагирующей на антиген, или ингибируется и/или не индуцируется ее пролиферация или секреция ею факторов или выполнение ею эффекторных функций. Однако в некоторых таких вариантах осуществления, при лигировании множества рецепторов, например, при встрече с клеткой, экспрессирующей первый и второй антигены, достигается желательный ответ, такой как полная иммунная активация или стимуляция, на что, например, указывает секреция одного или более

цитокинов, пролиферация, персистенция и/или выполнение иммунной эффекторной функции, такой как цитотоксическое уничтожение клетки-мишени.

[0753] В некоторых вариантах осуществления два рецептора индуцируют, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал в клетке, так что связывание одним из рецепторов его антигена активирует клетку или индуцирует ответ, но связывание вторым ингибирующим рецептором его антигена индуцирует сигнал, который подавляет или ослабляет этот ответ. Примерами являются комбинации активирующих CAR и ингибирующих CAR (iCAR). 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 в нормальных клетках, но не в клетках заболевания или состояния.

[0754] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, дополнительно включают ингибирующие CAR (ICAR, см. Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5 (215) (декабрь 2013 г.)), такие как CAR, распознающий антиген, отличный от антигена, связанного с и/или специфического для заболевания или состояния, в силу чего активирующий сигнал, доставляемый через нацеленный на заболевание CAR, уменьшается или ингибируется при связывании ингибирующего CAR с его лигандом, например, для уменьшения эффектов вне мишени.

[0755] В некоторых вариантах осуществления изобретения два рецептора индуцируют, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал в клетке, так что связывание одним из рецепторов его антигена активирует клетку или индуцирует ответ, но связывание вторым ингибирующим рецептором его антигена индуцирует сигнал, который подавляет или ослабляет этот ответ. Примерами являются комбинации активирующих CAR и ингибирующих CAR (iCAR). 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 в нормальных клетках, но не в клетках заболевания или состояния.

[0756] В некоторых аспектах химерный рецептор представляет собой или включает ингибирующий CAR (например, iCAR) и включает внутриклеточные компоненты, которые ослабляют или подавляют иммунный ответ, такой как ITAM-ответ и/или костимулированный ответ в клетке. Примерами таких внутриклеточных сигнальных компонентов являются те, которые обнаруживаются на молекулах иммунной контрольной точки, включая рецепторы PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, PGE2, аденозиновые рецепторы EP2/4, включая A2AR. В некоторых аспектах сконструированная клетка включает ингибирующий CAR, включающий сигнальный домен или производное такой ингибирующей молекулы, так что он служит для ослабления ответа клетки, например, индуцируемой активацией и/или костимуляторный CAR.

[0757] В некоторых вариантах осуществления стратегия множественного нацеливания применяется в случае, когда антиген, связанный с конкретным заболеванием или состоянием, экспрессируется в пораженной заболеванием клетке и/или экспрессируется в самой сконструированной клетке, либо транзиторно (например, после стимуляции в связи с генной инженерией) или постоянно. В таких случаях, при необходимости лигирования двух отдельных и индивидуально антигенспецифических рецепторов можно увеличить специфичность, селективность и/или эффективность.

[0758] В некоторых вариантах осуществления множество антигенов, например первый и второй антигены, экспрессируются в клетке, ткани или заболевании или состоянии, являющейся мишенью, например, в раковой клетке. В некоторых аспектах клетка, ткань, заболевание или состояние представляет собой множественную миелому или клетку множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления один или более из множества антигенов, как правило, также экспрессируются в клетке, на которую нежелательно воздействовать с помощью клеточной терапии, такой как нормальная или не пораженная болезнью клетка или ткань, и/или самих сконструированных клетках. В таких вариантах осуществления, при необходисти лигирования множества рецепторов для достижения ответа клетки достигается специфичность и/или эффективность.

B. Нуклеиновые кислоты, векторы и способы генной инженерии

[0759] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, например Т-клетки, сконструированы генно-инженерными методами для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструирование осуществляют путем введения полинуклеотидов, которые кодируют рекомбинантный рецептор. Также предложены полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантный рецептор, и векторы или конструкции, содержащие такие нуклеиновые кислоты и/или полинуклеотиды.

[0760] 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, происходящий от нативного полипептида. В других аспектах, сигнальная последовательность может кодировать гетерологичный или ненативный сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид альфа-цепи GMCSFR, представленной в SEQ ID NO: 25 и кодируемой 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. Неограничивающими иллюстративными примерами сигнальных пептидов являются, 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.

[0761] В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, содержит по меньшей мере один промотор, который функционально присоединяют для регуляции экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых примерах осуществления изобретения, полинуклеотид содержит два, три или более промоторов, функционально присоединенных для регуляции экспрессии рекомбинантного рецептора.

[0762] В некоторых случаях, когда молекулы нуклеиновой кислоты кодируют две или более различных полипептидных цепей, например, рекомбинантный рецептор и маркер, каждая полипептидная цепь может кодироваться отдельной молекулой нуклеиновой кислоты. Так, например, рассматриваются две отдельных нуклеиновых кислоты, каждая из которых может быть отдельно перенесена или введена в клетку для экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный рецептор, и нуклеиновую кислоту, кодирующую маркер, функционально присоединяют к одному и тому же промотору и разделяют, но необязательно, внутренним сайтом связывания с рибосомой (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает разрезание рибосомы, и который представляет собой, но необязательно, а T2A, а P2A, а E2A или F2a. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновые кислоты, кодирующие маркер и нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный рецептор, функционально присоединяют к двум различными промоторам. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, присутствуют в различных положениях клеточного генома, или встроены в эти положения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, вводят в композицию, содержащую культивируемые клетки, например, посредством ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

[0763] В некоторых вариантах осуществления изобретения, например, где полинуклеотид содержит первую и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, последовательности, кодирующие каждую из различных полипептидных цепей, могут быть функционально присоединены к промотору, и эти цепи могут быть одинаковыми или различными. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула нуклеиновой кислоты может содержать промотор, который запускает экспрессию двух или более различных полипептидных цепей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такие молекулы нуклеиновой кислоты могут быть мультицистронными (бицистронными или трицистронными, см., например, патент США US 6060273). В некоторых вариантах осуществления изобретения, транскрипционные единицы могут быть сконструированы в виде бицистронной единицы, содержащей IRES (внутренний сайт связывания с рибосомой), что позволяет обеспечивать коэкспрессию генных продуктов (например, кодирующих маркер и рекомбинантный рецептор) посредством одного промотора-мессенджера. Альтернативно, в некоторых случаях, один промотор

может регулировать экспрессию РНК, которая содержит, в одной открытой рамке считывания (ОРС), два или три гена (например, кодирующих маркер и рекомбинантный рецептор), отделенных друг от друга последовательностями, кодирующими саморасщепляющийся пептид (например, последовательности 2А), или сайтом распознавания протеазы (например, фурином). Таким образом, ОРС кодирует один полипептид, который, либо во время (в случае 2А), либо после трансляции, процессируется в отдельные белки. В некоторых случаях, пептид, такой как Т2А, может сообщать рибосоме способность блокировать (рибосомное вырезание) синтез пептидной связи у С-конца элемента 2А, что будет приводить к разделению конца последовательности 2А и следующего расположенного ниже пептида (см., например, de Felipe, Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) и de Felipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)). Различные элементы 2А являются ивестными. Примерами последовательностей 2А, которые могут быть использованы в раскрытых здесь способах и системах, являются, но не ограничиваются ими, последовательности 2А вируса ящура (F2A, например, SEQ ID NO: 21), вируса лошадиного ринита А (E2A, например, SEQ ID NO: 20), вируса Thosea asigna (T2A, например, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 17) и свиного теховируса-1 (P2A, например, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19) как описано в заявке на патент США US 2007/0116690.

[0764] Любой из описанных здесь рекомбинантных рецепторов может кодироваться полинуклеотидами, содержащими одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих рекомбинантные рецепторы, в любых комбинациях или реаранжировках. Так, например, один, два, три или более полинуклеотидов могут кодировать один, два, три или более различных полипептидов, например, рекомбинантных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, один вектор или одна конструкция содержат последовательность, кодирующую маркер, а отдельный вектор или отдельная конструкция содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновую кислоту, кодирующую маркер, и нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный рецептор, функционально присоединяют к двум различным промоторам. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, расположена ниже нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер.

[0765] В некоторых вариантах осуществления изобретения остов вектора содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более маркеров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более маркеров представляют собой маркер трансдукции, суррогатный маркер и/или маркер селекции.

[0766] В некоторых вариантах осуществления изобретения маркером является маркер трансдукции или суррогатный маркер. Маркер трансдукции или суррогатный маркер могут быть использованы для детектирования клеток, в которые был введен полинуклеотид, например, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В

некоторых вариантах осуществления изобретения, маркер трансдукции может идентифицировать или подтверждать модификацию клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, суррогатный маркер представляет собой белок, который был получен так, чтобы он коэкспрессировался на поверхности клетки вместе с рекомбинантным рецептором, например, CAR. В конкретных вариантах осуществления изобретения, такой суррогатный маркер представляет собой поверхностный белок, который был модифицирован так, чтобы он обладал незначительной активностью, или вообще не обладал такой активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения, суррогатный маркер кодируется тем же самым полинуклеотидом, который кодирует рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально присоединена к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер, и разделена, но необязательно, внутренним сайтом связывания с рибосомой (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает разрезание рибосомы, и который представляет собой последовательность 2A, такую как a T2A, a P2A, a E2A или a F2A. В некоторых случаях, могут быть использованы внешние маркерные гены в комбинации со сконструированной клеткой для детектирования или отбора клеток, а в некоторых случаях, также для стимуляции клеточного «суицида».

[0767] Иллюстративные суррогатные маркеры могут включать усеченные формы полипептидов клеточной поверхности, такие как как усеченные формы, которые не функционируют и не передают или не способны передавать сигнал или сигнал, обычно передаваемый полноразмерной формой полипептида клеточной поверхности, и/или не интернализуются или не способны к интернализации. Приводимые в качестве примера усеченные полипептиды клеточной поверхности включают усеченные формы факторов роста или других рецепторов, такие как усеченный рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (tHER2), усеченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR, приводимая в качестве примера последовательность tEGFR определена в SEQ ID NO: 7 или 16) или специфический для предстательной железы мембранный антиген (PSMA) или его модифицированная форма. tEGFR может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимабом (Erbitux®) или другим терапевтическим антителом против EGFR или связывающей молекулой, которая может использовать для идентификации или отбора клеток, которые были сконструированы с использованием конструкции для tEGFR и кодируемого экзогенного белка, и/или для устранения или отделения клеток, экспрессирующих кодируемый экзогенный белок (см. патент США US 8802374 и Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4):430-434)). В некоторых аспектах, маркер, например, суррогатный маркер, включает все или часть (например, усеченную форму) CD34, NGFR или рецептора эпидермального фактора роста (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновую кислоту, кодирующую маркер, функционально присоединяют к полинуклеотиду, кодирующему линкерную последовательность, такую

как расщепляемая линкерная последовательность, например, T2A. Так, например, маркер и, необязательно, линкерная последовательность могут представлять собой любую последовательность, описанную в заявкt PCT WO 2014/031687. Так, например, маркером может быть усеченный EGFR (tEGFR), который, но необязательно, присоединяют к линкерной последовательности, такой как расщепляемая линкерная последовательность T2A. Репрезентативный полипептид усеченного EGFR (например, tEGFR) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 или 16, или аминокислотную последовательность, которая идентична последовательности SEQ ID NO: 7 или 16 по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

[0768] В некоторых вариантах осуществления изобретения, маркер представляет собой или содержит флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцирующий белок (GFP), зеленый флуоресцирующий белок с повышенной интенсивностью флуоресценции (EGFP), такой как суперспирализованный GFP, красный флуоресцирующий белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцирующий белок (CFP), синий флуоресцирующий белок (BFP), синий флуоресцирующий белок с повышенной интенсивностью флуоресценции (EBFP) и флуоресцирующий белок (YFP), и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты и оптимизированные по кодонам и/или активированные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маркер представляет собой или включает фермент, такой как люцифераза, ген LacZ E. coli, щелочная фосфатаза, секретированная эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Иллюстративными генами-репортерами, излучающими свет, являются гены люциферазы (luc), β-галактозидазы, хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT), β-глюкуронидазы (GUS) или их варианты.

[0769] В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой маркер селекции. В некоторых вариантах осуществления маркер селекции представляет собой или включает полипептид, который придает устойчивость к экзогенным агентам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления маркер селекции представляет собой ген устойчивости к антибиотику. В некоторых вариантах осуществления маркер селекции представляет собой ген устойчивости к антибиотику, придающий устойчивость к антибиотику клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления маркер селекции 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.

[0770] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки с использованием инфекционных частиц рекомбинантных вирусов, таких как, например, векторы, происходящие из вакуолизирующего обезьяньего вируса (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного

вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносятся в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11):550-557).

[0771] В некоторых вариантах осуществления изобретения ретровирусный вектор имеет последовательность длинного концевого повтора (LTR). Например ретровирусный вектор, происходящий от вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), миелопролиферативного вируса саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мышей (MESV), вируса стволовых клеток мышей (MSCV), вируса некроза селезенки (SFFV), имеет последовательность длинного концевого повтора (LTR). Большинство ретровирусных векторов происходят от ретровирусов мышей. В некоторых вариантах осуществления ретровирусы включают те, которые происходят из любого источника клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы, как правило, являются амфотропными, что означает, что они способны инфицировать клетки-хозяева нескольких видов, включая людей. В одном варианте осуществления экспрессируемый ген заменяет ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Был описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (например, см. патенты США US 5219740; US 6207453; US 5219740; 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).

[0772] Способы лентивирусной трансдукции известны. Приводимые в качестве примера способы описаны, например, в Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeyen et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; and Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505.

[0773] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки путем электропорации (см. например, Chiaybam et al. (2013) PLoS ONE 8 (3):e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7 (16):1431-1437). В некоторых вариантах осуществления изобретения 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 & Ampand Sons, New York. NY), слияние протопластов, трансфекцию, опосредованную катионной липосомой; бомбардировку микрочастицами, усиленную частицами вольфрама (Johnston, Nature, 346:776-777); и совместное осаждение с фосфатом стронция (Brash et al. Mol. Cell Biol. 7:2031-2034 (1987)).

[0774] Другими подходами и векторами для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, являются те, которые описаны, например, в международной заявке WO 2014/055668 и в патенте США US 7446190.

[0775] В некоторых вариантах осуществления клетки, например Т-клетки, могут быть либо во время, либо после размножения, трансфицированы, например, Т-клеточным рецептором (TCR) или химерным рецептором антигена (CAR). Эта трансфекция для введения гена желательного рецептора может быть осуществлена с использованием, например, любого подходящего ретровирусного вектора. Затем популяция генетически модифицированных клеток может быть освобождена от исходного стимула (например, стимула в форме антитела против CD3/против CD28) и впоследствии подвергнута стимулированию с использованием второго типа стимула, например, через de novo введенный рецептор). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме молекулы пептид/MHC, узнаваемого (сшивающего) лиганда генетически введенного рецептора (например, природного лиганда CAR) или любого лиганда (такого как антитело), который непосредственно связывается в пределах нового рецептора (например, путем распознавания константных областей внутри рецептора). См., например, Cheadle et al, “Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy” Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66 или Barrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65:333-347 (2014).

[0776] В некоторых случаях может использоваться вектор, который не требует активации клеток, например Т-клеток. В некоторых таких случаях клетки могут быть отобраны и/или трансдуцированы до активации. Таким образом, клетки могут быть сконструированы до или после культивирования клеток, а в некоторых случаях одновременно или по меньшей мере части времени культивирования.

[0777] Дополнительными нуклеиновыми кислотами, например, генами для введения, являются гены, повышающие эффективность терапии, например, посредством стимуляции жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; гены, кодирующие генетический маркер для отбора и/или оценки клеток, например, для оценки выживаемости или локализации in vivo; гены для повышения безопасности, например, посредством получения клеток, восприимчивых к негативному отбору in vivo, как описано в 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., где описано использование бифункциональных селективных гибридных генов, полученных в результате присоединения доминантно позитивного селективного маркера к негативному селективному маркеру. См., например, Riddell et al., патент США US 6040177, кол. 14-17.

IV. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

[0778] В некоторых вариантах осуществления изобретения выходные композиции обогащенных Т-клеток, продуцируемых описанными здесь способами, такими как описано в Разделе I, используют в качестве средства клеточной терапии, например

адоптивной клеточной терапии. Сконструированные клетки полезны при различных терапевтических, диагностических и профилактических показаниях. Например, сконструированные клетки или композиции, содержащие сконструированные клетки, пригодны для лечения различных заболеваний и нарушений у субъекта. Такие способы и применения включают терапевтические способы и применения, например, включающие введение сконструированных клеток или композиций, содержащих их, субъекту, имеющему заболевание, состояние или нарушение, такое как опухоль или рак. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки или композиции, содержащие их, вводят в эффективном количестве для осуществления лечения заболевания или расстройства. Способы применения включают использование сконструированных клеток или композиций в таких способах и способах лечения, а также получение лекарственного средства для осуществления таких терапевтических методов. В некоторых вариантах осуществления способы осуществляют путем введения сконструированных клеток или композиций, содержащих их, субъекту, имеющему или предположительно имеющему заболевание или состояние, требующее лечения. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения представляются способы, которые обеспечивают лечение заболевания, состояния или нарушения у субъекта.

[0779] В конкретных вариантах осуществления изобретения одну или несколько клеточных композиций, например композиций выходных клеток, описанных здесь, вводят в качестве средства клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления способы, представленные здесь, обеспечивают получение одну выходную композицию обогащенных Т-клеток из входных клеток, выделенных, отобранных и/или обогащенных из одного биологического образца, где выходную композицию используют для введения в качестве средства клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна выходная композиция представляет собой композицию обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток. Способы введения клеток для проведения адоптивной клеточной терапии известны специалистам и могут быть применены в комбинации с рассматриваемыми здесь способами и композициями. Так, например, методы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в заявке на патент США US 2003/0170238, Gruenberg et al; в патенте США US 4690915, Rosenberg; в Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85), а также см. 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, подвергаемое лечению, может представлять собой любое заболевание или состояние, при котором экспрессия антигена ассоциируется с этиологией патологического состояния или расстройства и/или участвует в развитии такого патологического состояния или расстройства, например, вызывает, обостряет или каким-либо иным образом участвует в развитии такого заболевания, состояния или расстройства. Примеры заболеваний и состояний могут включать заболевания или состояния, ассоциированные со малигнизацией или трансформацией клеток (например, рака), аутоиммунные или воспалительные заболевания или инфекционное заболевание, например, вызываемое

бактериальным, вирусным или другим патогеном. Примеры антигенов, которые включают антигены, ассоциированные с различными заболеваниями и состояниями, которые могут быть подвергнуты лечению, описаны выше. В конкретных вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор или трансгенный TCR специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием.

[0780] Заболевание или состояние, подвергаемое лечению, может представлять собой любое заболевание или состояние, при котором экспрессия антигена ассоциируется с этиологией патологического состояния или расстройства и/или участвует в развитии такого патологического состояния или расстройства, например, вызывает, обостряет или каким-либо иным образом участвует в развитии такого заболевания, состояния или расстройства. Примеры заболеваний и состояний могут включать заболевания или состояния, ассоциированные со малигнизацией или трансформацией клеток (например, рака), аутоиммунные или воспалительные заболевания или инфекционное заболевание, например, вызываемое бактериальным, вирусным или другим патогеном. Примеры антигенов, которые включают антигены, ассоциированные с различными заболеваниями и состояниями, которые могут быть подвергнуты лечению, описаны выше. В конкретных вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор или трансгенный TCR специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием.

[0781] К числу заболеваний, состояний и нарушений относятся опухоли, включая солидные опухоли, злокачественные гематологические опухоли и меланомы, и в том числе локализованные и метастатические опухоли, инфекционные заболевания, такие как вирусная инфекция или инфекция, вызванная другим патогеном, например ВИЧ, HCV, HBV, CMV, HPV, и паразитарные заболевания, и аутоиммунные и воспалительные заболевания. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляет собой опухоль, рак, злокачественную опухоль, новообразование или другое пролиферативное заболевание или нарушение. Такие заболевания включают, без ограничения, лейкоз, лимфому, например острый миелоидный (или миелогенный) лейкоз (AML), хронический миелоидный (или миелогенный) лейкоз (CML), острый лимфоцитарный (или лимфобластный) лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточный лейкоз (HCL), лимфому из малых лимфоцитов (SLL), мантийноклеточную лимфому (MCL), лимфому маргинальной зоны, лимфому Беркитта, лимфому Ходжкина (HL), неходжкинскую лимфому (NHL), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL), фолликулярную лимфому, рефрактерную фолликулярную лимфому, диффузную крупно-В-клеточную лимфому (DLBCL) и множественную миелому (MM). Злокачественную В-клеточную опухоль выбирают из числа острых лимфобластных лейкозов (ALL), ALL у взрослых, хронических лимфобластных лейкозов (CLL), неходжкинской лимфомы (NHL) и диффузной крупно-В-клеточной лимфомы (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или состояние представляет собой NHL, и NHL выбирают из группы,

состоящей из агрессивной NHL, диффузной крупно-В-клеточной лимфомы (DLBCL), NOS (de novo и трансформированную из индолентной), первичной средостенной крупно-В-клеточной лимфомы (PMBCL), Т-клеточной/богатой гистиоцитами крупно-В-клеточной лимфомы(TCHRBCL), лимфомы Беркитта, мантийноклеточной лимфомы (MCL) и/или фолликулярной лимфомы (FL) и, необязательно, фолликулярной лимфомы степени 3B (FL3B).

[0782] В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или состояние представляет собой инфекционное заболевание или состояние, такое как, но без ограничения ими, вирусные, ретровирусные, бактериальные и протозойные инфекции, иммунодефицит, цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейна-Барр (EBV), аденовирус, полиомавирус ВК. В некоторых вариантах заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание или состояние, такое как артрит, например ревматоидный артрит (RA), диабет I типа, системная красная волчанка (SLE), воспалительное заболевание кишечника, псориаз, склеродермия, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, болезнь Грейвса, болезнь Крона, рассеянный склероз, астма и/или заболевание или состояние, связанное с трансплантацией.

[0783] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген, связанный с заболеванием или расстройством представляет собой или включает αvβ6 интегрин (avb6 интегрин), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250) антиген рака яичка, антиген рака яичка 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), раково-эмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, лиганд 1 хемокина, содержащего мотив C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), мутант рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин B2, рецептор-A2 эфрина (EPHa2), рецептор эстрогена, Fc-подобный рецептор типа 5 (FCR5; также известный как гомолог рецептора Fc 5 или FCR5), фетальный ацетилхолиновый рецептор (фетальный AchR), фолат-связывающий белок (FBP), фолатный рецептор альфа, ганглиозид GD2, O-ацетилированный ганглиозид GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), G-белок, сопряженный с рецептором семейства C, группы 5, член D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, высокомолекулярный антиген, связанный с меланомой человека (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита B, лейкоцитарный антиген A1 человека (HLA-A1), лейкоцитарный антиген A2 человека (HLA-A2), альфа-рецептор IL-22 (IL-22Rα), альфа-2 рецептор IL-13 (IL-13Rα2), рецептор, содержащий домен вставки киназы (kdr), легкая цепь каппа, молекула адгезии клеток L1 (L1-CAM), эпитоп CE7 L1-CAM, богатый лейцином повтор, содержащий 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, связанный с меланомой антиген 1 (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), c-Met, мышиный цитомегаловирус

(CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, члены класса D группы 2 природных киллеров (NKG2D), мелан A (MART-1), молекула адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетальный антиген, преимущественно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, специфический антиген простаты, антиген стволовых клеток простаты (PSCA), специфический мембранный антиген простаты (PSMA), рецепторная тирозинкиназа, рецептора-сироты рецепторных тирозинкиназ типа 1 (ROR1), сурвивин, гликопротеин трофобластов (TPBG, также известный как 5T4), гликопротеин 72, связанный с опухолью (TAG72), связанный с тирозиназой белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), связанный с тирозиназой 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), опухоль Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или экспрессируемый патогеном антиген sed, или антиген, связанный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены, на которые нацелены рецепторы в некоторых вариантах осуществления, включают в себя антигены, связанные с воспалением B-клеток, из числа известных маркеров B-клеток. 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.

[0784] В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или состояние представляет собой злокачественную B-клеточную опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная B-клеточная опухоль представляет собой лейкоз или лимфому. В некоторых аспектах заболевание или состояние представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ALL), ALL у взрослых, хронический лимфобластный лейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL) или диффузную крупно-B-клеточную лимфому (DLBCL). В некоторых случаях заболевание или состояние представляет собой NHL, например, или в том числе NHL, которая представляет собой агрессивную NHL, диффузную B-клеточную лимфому (DLBCL), NOS (de novo и трансформированную из индолентной), первичную средостенную крупно-B-клеточную лимфому (PMBCL), T-клеточную/богатую гистиоцитами крупно-B-клеточную лимфому (TCHRBCL), лимфому Беркитта, мантийноклеточную лимфому (MCL) и/или фолликулярную лимфому (FL), необязательно, фолликулярную лимфому степени 3B (FL3B). В некоторых аспектах рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфически связывается с антигеном, связанным с заболеванием или состоянием или экспрессируемым в клетках окружения очага поражения, связанного со злокачественной B-клеточной опухолью. В некоторых вариантах осуществления антигены, на которые нацелены рецепторы, включают антигены, связанные со злокачественной B-клеточной опухолью, такие как любой из известных B-клеточных маркеров. В некоторых вариантах антиген, на который нацелен рецептор, представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1,

CD45, CD21, CD5, CD33, Ig каппа, Ig лямбда, CD79a, CD79b или CD30, или их комбинацию.

[0785] В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или состояние представляет собой миелому, такую как множественная миелома. В некоторых аспектах рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием, или экспрессируется в клетках, окружающую область поражения, связанного с множественной миеломой. В некоторых вариантах осуществления антигены, нацеливаемые рецепторами, включают антигены, ассоциированные с множественной миеломой. В некоторых аспектах антиген, например, второй или дополнительный антиген, такой как антиген-специфический антиген и/или родственный антиген, экспрессируется на клетках множественной миеломы. Такой антиген представляет собой антиген созревания В-клеток (BCMA), G-белок, сопряженный с рецептором семейства С группы 5, член D (GPRC5D), CD38 (циклическая АДФ рибозогидролаза), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, CD2 подгруппы 1, CRACC, SLAMPF7, CD319 и 19A24), BAFF-R, TACI и/или FcRH5. Другие примеры антигенов множественной миеломы включают CD56, TIM-3, CD33, CD123, CD44, CD20, CD40, CD74, CD200, EGFR, β2-микроглобулин, HM1.24, IGF-1 R, IL-6R, TRAIL-R1 и рецептиор активина типа IIA (ActRIIA). См. Benson and Byrd, J Clin. Oncol. (2012) 30 (16):2013-15; Tao and Anderson, Bone Marrow Research (20l):924058; Chu et al., Leukemia (2013) 28 (4):917-27; Garfall et al., Discov Med. (2014) 17(91):37-46. В некоторых вариантах осуществления антигены включают антигены, присутствующие на лимфоидных опухолях, при миеломе, лимфоме, связанной со СПИДом и/или посттрансплантационной лимфопролиферации, например, CD38. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, направленные против таких антигенов, известны и включают, например, антитела, описанные в патентах США US 8153765, US 8603477, US 8008450, заявке на патент США US 2012-0189622 или заявке на патент США US 2010/0260748; и/или в международных заявках PCT WO 2006/099875, WO 2009/080829, WO 2012/092612, WO 2012/092612 или WO 2014210064. В некоторых вариантах осуществления такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (например, scFv) присутствуют в мультиспецифических антителах, мультиспецифических химерных рецепторах, таких как мультиспецифических CAR, и/или в мультиспецифических клетках.

[0786] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения заболевание или расстройство связано с экспрессией сопряженного с G-белком рецептора класса С группы 5, член D (GPRC5D), и/или экспрессии антигена созревания В-клеток (BCMA).

[0787] В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой расстройство, связанное с В-клетками. В некоторых из вариантов осуществления предлагаемых способов заболевание или расстройство, связанное с BCMA, представляет собой аутоиммунное заболевание или нарушение. В некоторых из вариантов осуществления предлагаемых способов аутоиммунное заболевание или расстройство представляет собой системную красную волчанку (SLE), красную волчанку,

воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, связанный с ANCA васкулит, идиопатическую пурпурную тромбоцитопению (ITP), тромботическую пурпурную тромбоцитопению (TTP), аутоиммунную тромбоцитопению, болезнь Чагаса, болезнь Грейвса, гранулематоз Вегенера, полиартериит нодоса, синдром Шегрена, пузырчатку обыкновенную, склеродермию, рассеянный склероз, псориаз, IgA-нефропатию, IgM-полиневропатии, васкулит, сахарный диабет, синдром Рейно, синдром антифосфолипида, болезнь Гудпасчера, болезнь Кавасаки, аутоиммунную гемолитическую анемию, миастению гравис или прогрессирующий гломерулонефрит.

[0788] В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или расстройство представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак, экспрессирующий GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой злокачественное новообразование клеток плазмы, и злокачественное новообразование клеток плазмы представляет собой множественную миелому (ММ) или плазмацитому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой множественную миелому (ММ). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рецидивирующую/рефрактерную множественную миелому.

[0789] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой или включает специфический для патогена или экспрессируемый патогеном антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой вирусный антиген (такой как вирусный антиген из ВИЧ, HCV, HBV и т.д.), бактериальные антигены и/или паразитные антигены.

[0790] В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например адоптивную Т-клеточную терапию, проводят аутологичным переносом, в котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, который должен получать клеточную терапию, или из образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах клетки получают от субъекта, например пациента, нуждающегося в лечении, и клетки, после выделения и обработки, вводят этому же субъекту.

[0791] В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют путем аллогенного переноса, в котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, отличного от субъекта, который должен получить или который в конечном счете получает клеточную терапию, например от первого субъекта. В таких вариантах клетки затем вводят другому субъекту, например, второму субъекту, относящемуся к такому же виду. 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 один и тот же -класс или супертип HLA, как и первый субъект.

[0792] Клетки можно вводить любым подходящим способом, например болюсной инфузией, инъекцией, например внутривенными или подкожными инъекциями,

внутриглазной инъекцией, периокулярной инъекцией, субретинальной инъекцией, инъекцией в стекловидное тело, транс-септальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, внутрихориоидальной инъекцией, интракамерной инъекцией, субконъюнктивальной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перибульбарной инъекцией или инъекцией в заднюю слизисто-склеральную область. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют парентерально, внутрилегочным и интраназальным путем, и, если желательно, для местного лечения осуществляют внутрипросветное введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах заданную дозу клеток вводят путем однократного болюсного введения. В некоторых вариантах осуществления введение клеток осуществляют путем многократного болюсного введения, например, в течение не более чем 3 дней, или путем непрерывного введения клеток инфузией. В некоторых вариантах введение дозы клеток или любую дополнительную терапию, например лимфоистощающую терапию, хирургическую терапию и/или комбинированную терапию, осуществляют амбулаторно.

[0793] Для предотвращения или лечения заболевания подходящая доза может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, независимо от того, введены ли клетки в профилактических или терапевтических целях, от предшествующей терапии, клинической истории субъекта и его реакции на клетки, а также с учетом мнения и по усмотрению лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления композиции и клетки вводят подходящим образом субъекту одновременно или в виде серии введений.

[0794] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки вводят как часть комбинированного лечения, например одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством, в котором используют антитело или сконструированную клеткуили рецептор, или агент, такой как цитотоксический или терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами или вместе с другим терапевтическим вмешательством либо одновременно, либо последовательно, и в любом порядке. В некоторых случаях клетки вводят совместно или достаточно близко по времени с другой терапией, так что клеточные популяции усиливают действие одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов или наоборот. В некоторых вариантах клетки вводят до введения одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят после введения одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более дополнительных агентов включают цитокин, такой как IL-2, например, для повышения персистенции. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение химиотерапевтического агента.

[0795] В некоторых вариантах осуществления способы включают введение химиотерапевтического агента, например кондиционирующего химиотерапевтического агента, например, для уменьшения опухолевой нагрузки до введения.

[0796] Предварительное кондиционирование субъектов с помощью иммуноистощающей терапии (например, противолимфоцитарной терапии) в некоторых случаях могут улучшить эффекты адоптивной клеточной терапии (ACT).

[0797] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту до начала клеточной терапии агента для предварительного кондиционирования, такого как противолимфоцитарный или химиотерапевтический агент, например, циклофосфамида, флударабина или их комбинации. Например, субъекту можно вводить агент для предварительного кондиционирования 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 субъекту вводят агент для предварительного кондиционирования не более чем за 7 дней, например, не более чем за 6, 5, 4, 3 или 2 дня до начала клеточной терапии.

[0798] В некоторых вариантах осуществления субъекта подвергают предварительному кондиционированию с использованием циклофосфамида в дозе между или приблизительно между 20 мг/кг и 100 мг/кг, например между или приблизительно между 40 мг/кг и 80 мг/кг. В некоторых аспектах субъекта подвергают предварительному кондиционированию с использованием 60 мг/кг циклофосфамида или с использованием приблизительно 60 мг/кг циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в однократной дозе или в виде множества доз, назначаемых, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах циклофосфамид вводят один раз в день в течение одного или двух дней. В некоторых вариантах осуществления, когда противолимфоцитарный агент включает циклофосфамид, субъекту вводят циклофосфамид в дозе между или приблизительно между 100 мг/м^2 и 500 мг/м^2, например между или приблизительно между 200 мг/м^2 и 400 мг/м^2 или 250 мг/м^2 и 350 мг/м^2, включительно. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 300 мг/м^2 циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид может вводиться в однократной дозе или может вводиться во множестве доз, например, назначаемых ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например в течение 3-5 дней. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 300 мг/м^2 циклофосфамида ежедневно в течение 3 дней до начала клеточной терапии.

[0799] В некоторых вариантах осуществления, когда противолимфоцитарное средство включает флударабин, субъекту вводят флударабин в дозе между или приблизительно между 1 мг/м^2 и 100 мг/м^2, например между или приблизительно между 10 мг/м^2 и 75 мг/м^2, 15 мг/м^2 и 50 мг/м^2, 20 мг/м^2 и 40 мг/м^2 или 24 мг/м^2 и 35 мг/м^2, включительно. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 30 мг/м^2 флударабина. В некоторых вариантах осуществления флударабин может вводиться в

однократной дозе или может вводиться во множестве доз, например, назначаемых ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например в течение 3-5 дней. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 30 мг/м^2 флударабина ежедневно в течение 3 дней до начала клеточной терапии.

[0800] В некоторых вариантах осуществления противолимфоцитарный агенто включает комбинацию агентов/средств, такую как комбинация циклофосфамида и флударабина. Таким образом, комбинация может включать циклофосфамид в любой дозе или схеме введения, такой как описано выше, и флударабин в любой дозе или схеме введения, такой как описано выше. Например, в некоторых аспектах субъекту вводят 60 мг/кг (~2 г/м^2) циклофосфамида и от 3 до 5 доз 25 мг/м^2 флударабина перед первой или последующей дозой.

[0801] После введения клеток биологическую активность сконструированных клеточных популяций в некоторых вариантах измеряют, например, любым из известных способов. Параметры для оценки включают специфическое связывание сконструированной или природной Т-клетки или другой иммунной клетки с антигеном in vivo, например, с помощью визуализации, или ex vivo, например, с помощью ELISA или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления способность сконструированных клеток разрушать клетки-мишени можно измерить, используя любые подходящие известные способы, такие как анализы цитотоксичности, описанные, например, в Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), и в Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004). В некоторых вариантах осуществления изобретения биологическую активность клеток измеряют путем анализа экспрессии и/или секреции одного или нескольких цитокинов, таких как Cd107a, IFNγ, IL-2 и TNF. В некоторых аспектах биологическую активность измеряют путем оценки клинического результата, такого как уменьшение пухоли или снижение опухолевой нагрузки.

[0802] В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки дополнительно модифицируют любыми способами чтобы увеличить их терапевтическую или профилактическую эффективность. Например, сконструированный CAR или TCR, экспрессированный популяцией клеток, может быть конъюгирован либо непосредственно, либо косвенно через линкер, с нацеливающим фрагментом. Практика конъюгирования соединений, например CAR или TCR, с нацеливающими частями известна (см. например, Wadwa et al. J Drug targeting 3:1 1 1 (1995) и патент США US 5087616).

[0803] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят как часть комбинированного лечения, например одновременно или последовательно, или в любом порядке с другим терапевтическим вмешательством, где лечение включает введение антитела или сконструированной клетки или рецептора, или агента, такого как цитотоксический или терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами или вместе с другим терапевтическим вмешательством либо одновременно, либо

последовательно, и в любом порядке. В некоторых случаях клетки вводят совместно с другой терапией, в течение достаточно близкого времени, так что клеточные популяции усиливают действие одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов или наоборот. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки вводят до введения одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят после введения одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько дополнительных агентов включают цитокин, такой как IL-2, например, для повышения персистентности.

A. Дозирование

[0804] В некоторых вариантах осуществления изобретения дозу клеток, например, выходных клеток, описанных здесь в Разделе I-G, вводят субъектам в соответствии с представленными способами, и/или в виде продуктов или композиций. В некоторых вариантах осуществления размер или периодичность введения доз определяют в зависимости от конкретного заболевания или состояния у субъекта. В некоторых случаях размер или периодичность введения доз в случае конкретного заболевания может быть определено эмпирически в свете представленного описания.

[0805] В некоторых вариантах осуществления изобретения доза клеток составляет от или приблизительно от 2×10^5 клеток/кг до или приблизительно до 2×10^6 клеток/кг, например, от или приблизительно от 4×10^5 клеток/кг до или приблизительно до 1×10^6 клеток/кг, или от или приблизительно от 6×10^5 клеток/кг до или приблизительно до 8×10^5 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения, доза клеток составляет не более, чем 2×10^5 клеток (например, антиген-экспрессирующих, таких как CAR-экспрессирующих клеток) на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, не более, чем или приблизительно 3×10^5 клеток/кг, не более, чем или приблизительно 4×10^5 клеток/кг, не более, чем или приблизительно 5×10^5 клеток/кг, не более, чем или приблизительно 6×10^5 клеток/кг, не более, чем или приблизительно 7×10^5 клеток/кг, не более, чем или приблизительно 8×10^5 клеток/кг, не более, чем или приблизительно 9×10^5 клеток/кг, не более, чем или приблизительно 1×10^6 клеток/кг, или не более, чем или приблизительно 2×10^6 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза клеток составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 2×10^5 клеток (например, антиген-экспрессирующих, таких как CAR-экспрессирующих клеток) на килограмм массы тела субъектаа (клеток/кг), например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 3×10^5 клеток/кг, составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 4×10^5 клеток/кг, составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 5×10^5 клеток/кг, составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 6×10^5 клеток/кг, составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 7×10^5 клеток/кг, составляет по меньшей мере или по меньшей

мере приблизительно или точно или приблизительно 8 × 10^5 клеток/кг, составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 9 × 10^5 клеток/кг, составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 1 × 10^6 клеток/кг, или составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 2 × 10^6 клеток/кг.

[0806] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки или отдельные популяции подтипов клеток вводят субъекту в диапазоне от приблизительно одного миллиона до приблизительно 100 миллиардов клеток и/или из расчета количества клеток на килограмм веса тела, например, от 1 миллиона до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 5 миллионов клеток, приблизительно 25 миллионов клеток, приблизительно 500 миллионов клеток, приблизительно 1 миллиард клеток, приблизительно 5 миллиардов клеток, приблизительно 20 миллиардов клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 40 миллиардов клеток или в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений), например, от приблизительно 10 миллионов до приблизительно 100 миллиардов клеток (например, приблизительно 20 миллионов клеток, приблизительно 30 миллионов клеток, приблизительно 40 миллионов клеток, приблизительно 60 миллионов клеток, приблизительно 70 миллионов клеток, приблизительно 80 миллионов клеток, приблизительно 90 миллионов клеток, приблизительно 10 миллиардов клеток, приблизительно 25 миллиардов клеток, приблизительно 50 миллиардов клеток, приблизительно 75 миллиардов клеток, приблизительно 90 миллиардов клеток, или в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеуказанных значений), и в некоторых случаях от или приблизительно от 100 миллионов клеток до или приблизительно до 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 120 миллионов клеток, приблизительно 250 миллионов клеток, приблизительно 350 миллионов клеток, приблизительно 450 миллионов клеток, приблизительно 650 миллионов клеток, приблизительно 800 миллионов клеток, приблизительно 900 миллионов клеток, приблизительно 3 миллиарда клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 45 миллиардов клеток) или любое значение между этими диапазонами и/или на килограмм веса тела. Дозы могут изменяться в зависимости от особенностей, специфических для заболевания или нарушения, и/или субъекта и/или других способов лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза клеток представляет собой постоянную дозу клеток или фиксированную дозу клеток, так что доза клеток не связана и не основана на площади поверхности тела или массе субъекта.

[0807] В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъектом является человек, доза включает менее чем приблизительно 1 x 10^8 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), например, в диапазоне приблизительно от 1 × 10^6 до 1 × 10^8 таких клеток, например 2 × 10^6, 5 × 10^6, 1 × 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 1,5 x 10^8 или 5 x 10^8 всех таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя из вышеуказанных значений. В

некоторых вариантах осуществления, например, когда субъектом является человек, доза включает более или приблизительно более 1×10^6 клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), и менее или приблизительно менее 2×10^9 всех клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), например, в диапазоне от или приблизительно от $2,5 \times 10^{10}$ до или приблизительно до $1,2 \times 10^{10}$ таких клеток, в частности, в количестве равном или приблизительно равном $2,5 \times 10^7$, 5×10^7, 1×10^8, $1,5 \times 10^8$, 8×10^8 или $1,2 \times 10^9$ всех таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя из вышеуказанных значений.

[0808] В некоторых вариантах осуществления до или приблизительно доза генно-инженерных клеток составляет от или приблизительно от или приблизительно от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до 5×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до 5×10^7 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до $2,5 \times 10^7$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до 1×10^7 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до 5×10^6 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до $2,5 \times 10^6$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до 1×10^6 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 5×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 5×10^7 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до $2,5 \times 10^7$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 1×10^7 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 5×10^6 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до $2,5 \times 10^6$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от $2,5 \times 10^6$ до или приблизительно до 5×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от $2,5 \times 10^6$ до или приблизительно до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от $2,5 \times 10^6$ до или приблизительно до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от $2,5 \times 10^6$ до или приблизительно до 5×10^7 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от $2,5 \times 10^6$ до или приблизительно до $2,5 \times 10^7$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от $2,5 \times 10^6$ до или приблизительно до

1×10^7 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от $2,5 \times 10^6$ до или приблизительно до 5×10^6 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 5×10^6 до или приблизительно до 5×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 5×10^6 до или приблизительно до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 5×10^6 до или приблизительно до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 5×10^6 до или приблизительно до 5×10^7 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 5×10^6 до или приблизительно до $2,5 \times 10^7$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 5×10^6 до или приблизительно до 1×10^7 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до 5×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до 5×10^7 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до $2,5 \times 10^7$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от $2,5 \times 10^7$ до или приблизительно до 5×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от $2,5 \times 10^7$ до или приблизительно до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от $2,5 \times 10^7$ до или приблизительно до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от $2,5 \times 10^7$ до или приблизительно до 5×10^7 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 5×10^7 до или приблизительно до 5×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 5×10^7 до или приблизительно до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 5×10^7 до или приблизительно до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^8 до или приблизительно до 5×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^8 до или приблизительно до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток или от или приблизительно от $2,5 \times 10^8$ до или приблизительно до 5×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза генетически сконструированных клеток составляет от или приблизительно от $2,5 \times 10^{10}$ до или приблизительно до $1,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, например, от или приблизительно от 5×10^7 до или приблизительно до 1×10^9 экспрессирующих CAR Т-клеток.

[0809] В некоторых вариантах осуществления изобретения, доза генетически сконструированных клеток составляет по меньшей мере или приблизительно 1×10^5 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно 5×10^5 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно 5×10^5 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно 1×10^6 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно $2,5 \times 10^6$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно 5×10^6 CAR-

экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно 1×10^7 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно $2,5 \times 10^7$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно 5×10^7 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно 1×10^8 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 5×10^6 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1×10^7 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере $2,5 \times 10^7$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по приблизительно меньшей мере 5×10^7 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1×10^8 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере $2,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих клеток, или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 5×10^8 CAR-экспрессирующих клеток.

[0810] В некоторых вариантах осуществления изобретения клеточная терапия включает введение дозы клеток, содержащей Т-клетки или мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), в количестве от или приблизительно от 1×10^5 до 5×10^8 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, дозы клеток, содержащей Т-клетки или мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), в количестве от или приблизительно от 5×10^5 до или приблизительно до 1×10^7 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, или дозы клеток, содержащей Т-клетки или мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), в количестве от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 1×10^6 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия включает введение дозы клеток, содержащей Т-клетки или мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), в количестве по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1×10^5 клеток, в частности, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1×10^6, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1×10^7 по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1×10^8 таких клеток. В некоторых вариантах осуществления это количество относится к общему числу CD3-экспрессирующих или CD8-экспрессирующих клеток, а в некоторых случаях это количество также экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR+) клеток. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия включает введение дозы, включающей количество клеток от или приблизительно от 1×10^5 до 5×10^8 всех CD3+ или CD8+ Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD3+ или CD8+ клеток, от или приблизительно от 5×10^5 до 1×10^7 всех CD3+ или CD8+ Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD3+ или CD8+ клеток, или от или приблизительно от 1×10^6 до 1×10^7 всех CD3+ или CD8+ Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD3+ или CD8+ клеток, включительно каждое значение. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия включает введение дозы,

включающей количество клеток от или приблизительно от 1×10^5 до 5×10^8 всех CD3+/CAR+ или CD8+/CAR+ клеток, от или приблизительно от 5×10^5 до 1×10^7 всех CD3+/CAR+ или CD8+/CAR+ клеток, или от или приблизительно от 1×10^6 до 1×10^7 CD3+/CAR+ или CD8+/CAR+ клеток, включая граничные значения.

[0811] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки в дозе включают CD4-экспрессирующие Т-клетки, CD8-экспрессирующие Т-клетки или CD4-экспрессирующие и CD8-экспрессирующие Т-клетки.

[0812] В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъект является человеком, количество CD8-экспрессирующих Т-клетки в дозе, включая дозу, которая содержит CD4-экспрессирующие и CD8-экспрессирующие Т-клетки, включают от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 5×10^8 CD8+ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), например в диапазоне от или приблизительно от 5×10^6 до или приблизительно до 1×10^8 таких клеток, в частности, в количестве 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 клеток, включая значения в интервалах между любыми двумя из указанных выше значений. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят множество доз, и каждая из доз или суммарная доза может находиться в пределах любого из вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает от или приблизительно от 1×10^7 до $0{,}75 \times 10^8$ всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^7 до $2{,}5 \times 10^7$ всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^7 до $0{,}75 \times 10^8$ всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, включая граничные значения. В некоторых вариантах осуществления доза клеток содержит или приблизительно содержит 1×10^7, $2{,}5 \times 10^7$, 5×10^7, $7{,}5 \times 10^7$, 1×10^8 или 5×10^{78} всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток.

[0813] В некоторых вариантах осуществления дозу клеток, например, Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят субъекту в виде однократной дозы или вводят только один раз в течение двух недель, одного месяца, трех месяцев, шести месяцев, 1 года или более.

[0814] В контексте адоптивной клеточной терапии введение заданной «дозы» включает введение заданного количества клеток в виде единой композиции и/или одним непрерывным введением, например, в виде однократной инъекции или непрерывной инфузии, а также включает введение заданного количества клеток в виде разделенной дозы или в виде множества композиций, где клетки представлены во множестве отдельных композиций для инъекций или инфузий, выполняемых в течение определенного периода времени, например, в течение не более чем 3 дней. Таким образом, в некоторых случаях доза является единичной дозой или предусматривает непрерывное введение определенного количества клеток в один момент времени. Однако в некоторых случаях дозу вводят в виде многократных инъекций или инфузий в течение периода не более трех дней, например один раз в день в течение трех дней или в течение

двух дней, или путем многократных инфузий в течение одного дня.

[0815] Таким образом, в некоторых аспектах дозу клеток вводят в виде единичной дозы фармацевтической композиции В некоторых вариантах осуществления изобретения дозу клеток вводят в виде множества композиций, содержащих совместно необходимую дозу клеток.

[0816] В некоторых вариантах осуществления изобретения термин «разделенная доза» (или «дробная доза») относится к дозе, которая разделена на несколько доз, и ее вводят в течение более чем одного дня. Этот тип дозирования охватывается настоящими способами, и рассматривается как разовая доза.

[0817] Таким образом, дозу клеток можно вводить в виде разделенной дозы, например, разделенной дозы, вводимой в течение определенного переиода времени. Например, в некоторых вариантах осуществления доза может вводиться субъекту в течение 2 дней или в течение 3 дней. Примеры способов с раздельным дозированием включают введение 25% дозы в первый день и введение остальных 75% дозы на второй день. В других вариантах осуществления изобретения, 33% дозы могут быть введены в первый день, а остальные 67% вводят на второй день. В некоторых аспектах, 10% дозы вводят в первый день, 30% дозы вводят на второй день, а 60% дозы вводят на третий день. В некоторых вариантах осуществления изобретения, дробную дозу вводят в течение не более 3-х дней.

[0818] В некоторых вариантах осуществления изобретения дозы клеток могут быть введены путем введения множества композиций или растворов, таких как первые и вторые композиции и растворы, а возможно и более, каждые из которых содержат некоторое количество клеток дозы. В некоторых аспектах множество композиций, каждая из которых содержит клетки различных популяций и/или подтипов, вводят отдельно или независимо, необязательно в течение определенного периода времени. Так, например, популяция или подтипы клеток могут включать CD8+ и CD4+ Т-клетки, соответственно, и/или популяции, обогащенные CD8+ и/или CD4+ клетками, соответственно, например, CD4+ и/или CD8+ Т-клетками, каждая из которых отдельно включает клетки, генетически сконструированные так, чтобы они экспрессировали рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, введение дозы включает введение первой композиции, содержащей дозу CD8+ Т-клеток или дозу CD4+ Т-клеток, и введение второй композиции, содержащей другую дозу CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток.

[0819] В некоторых вариантах осуществления введение композиции или дозы, например введение множества клеточных композиций, включает введение композиций клеток по отдельности. В некоторых аспектах отдельные введения осуществляют одновременно или последовательно в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза включает первую композицию и вторую композицию, где первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от 0 до 12 часов, от 0 до 6 часов или от 0 до 2 часов. В некоторых вариантах начало введения первой композиции и начало введения второй композиции осуществляют с интервалами не более,

чем 2 часов, не более чем 1 часа или не более, чем 30 минут, не более, чем 15 минут, не более, чем 10 минут или не более, чем 5 минут. В некоторых вариантах начало и/или завершение введения первой композиции и завершение и/или начало введения второй композиции осуществляют с интервалами не более, чем в 2 часа, не более чем в 1 час или не более, чем в 30 минут, не более, чем в 15 минут, не более, чем в 10 минут или не более, чем в 5 минут.

[0820] В некоторых вариантах композиции, первая композиция, например, первая доза композиция, включает CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах композиции, первая композиция, например, первая композиция дозы, включает CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах первую композицию вводят до введения второй композиции.

[0821] В некоторых вариантах осуществления изобретения доза или композиция клеток включает определенное или целевое соотношение CD4+-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и CD8+ клеток, экспрессирующим рекомбинантный рецептор, и/или CD4+ клеток и CD8+ клеток, где такое отношение составляет, но необязательно, приблизительно 1:1 или в интервале от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1, например, приблизительно 1:1. В некоторых аспектах введение композиции или дозы с целевым или нужным соотношением различных клеточных популяций (таким как соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток, или соотношение CAR+ CD4+ клеток и CAR+ CD8+ клеток, составляющее, например, 1:1) включает введение клеточной композиции, содержащей одну из популяций, а затем введение отдельной клеточной композиции, содержащей клетки другой популяции, где введение осуществляют в целевом или нужном соотношении или приблизительно в таких соотношениях. В некоторых аспектах введение дозы или композиции клеток в определенном соотношении способствует повышению степени размножения, персистентности и/или противоопухолевой активности Т-клеток, используемых в Т-клеточной терапии.

[0822] В некоторых вариантах осуществления изобретения субъекту вводят несколько доз, например, две или более дозы или несколько последовательных доз клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъекту вводят две дозы. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят дозы последовательно, например, вторую дозу вводят приблизительно через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день после введения первой дозы. В некоторых вариантах несколько последовательных доз вводят после первой дозы, так, чтобы дополнительная доза или дополнительные дозы были введены после введения последующей дозы. В некоторых аспектах количество клеток, вводимых субъекту в дополнительной дозе, является таким же, или аналогичным количеству клеток в первой дозе и/или в последующей дозе. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительная доза или дополнительные дозы превышают дозы, введенные до этого.

[0823] В некоторых аспектах изобретения размер первой и/или последующий дозы определяют на основе одного или более критериев, таких как реакция субъекта на ранее проводимое лечение, например, химиотерапию, тяжесть заболевания у субъекта,

например, опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, уровень или тип метастазирования, стадия и/или вероятность или возможность развития у субъекта токсических эффектов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа у хозяина на введение клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

[0824] В некоторых аспектах время между введением первой дозы и введением последующей дозы составляет приблизительно от 9 до приблизительно 35 дней, приблизительно от 14 до приблизительно 28 дней, или от 15 до 27 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение последующей дозы осуществляют более, чем приблизительно через 14 дней и менее, чем приблизительно 28 дней после введения первой дозы. В некоторых аспектах время между введением первой дозы и введением последующей дозы составляет приблизительно 21 день. В некоторых вариантах осуществления дополнительная дозу или дозы, например, последующие дозы, вводят после введения последующей дозы. В некоторых аспектах дополнительную последующую дозу или дозы вводят по меньшей мере, приблизительно через 14 и менее, чем приблизительно через 28 дней после введения предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительную дозу вводят менее чем приблизительно через 14 дней после введения предыдущей дозы, например, через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 дней после введения предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, менее чем приблизительно через 14 дней после предыдущей дозы, дозу не вводят, и/или дозу не вводят более чем приблизительно через 28 дней после введения предыдущей дозы.

[0825] В некоторых вариантах осуществления изобретения, доза клеток, например, клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, включает две дозы (например, двойную дозу), содержащую первую дозу Т-клеток и последующую дозу Т-клеток, где введение одной или обеих первой дозы и второй дозы включает введение разделенной/дробной дозы Т-клеток.

[0826] В некоторых вариантах осуществления доза клеток, как правило, является достаточно большой, чтобы она была эффективной для снижения тяжести заболеваемости.

[0827] В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в заданной дозе, которая в некоторых аспектах включает желаемую дозу или количество клеток или клеток определенного типа(ов) и/или желаемое отношение клеток определенных типов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения дозу клеток вычисляют исходя из общего количества клеток (или количества клеток на килограмм массы тела) и желаемого соотношения отдельных популяций или подтипов, таких как соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения дозу клеток вычисляют исходя из желаемого общего количества клеток (или количества клеток на килограмм массы тела) в отдельных популяциях клеток или клеток отдельных типов. В некоторых вариантах осуществления изобретения дозу клеток вычисляют исходя из

комбинации таких признаков, как желаемое количество всех клеток, необходимое соотношение и желаемое общее количество клеток в отдельных популяциях.

[0828] В некоторых вариантах осуществления изобретения популяции или подтипы клеток, таких как CD8+ и CD4+ Т-клетки, вводят в пределах или интервалах допустимых различий желаемых доз всех клеток, таких как желаемая доза Т-клеток. В некоторых аспектах, нужная доза представляет собой желаемое количество клеток или желаемое количество клеток в расчете на единицу массы тела субъекта, которому вводят эти клетки, например, клеток на килограмм массы тела. В некоторых аспектах нужная доза составляет или превышает минимальное количество клеток или минимальное количество клеток в расчете на единицу массы тела. В некоторых аспектах из всех клеток, вводимых в нужной дозе, клетки отдельных популяций или подтипов присутствуют в соотношении или приблизительно в нужном конечном соотношении (таком как соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток), например, в пределах определенных допустимых различий или ошибок такого отношения.

[0829] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки вводят в пределах или интервалах допустимых различий желаемой дозы одной или более отдельных популяций или подтипов клеток, таких как желаемая доза CD4+ клеток и/или желаемая доза CD8+ клеток. В некоторых аспектах желаемой дозой является нужное количество клеток определенного подтипа или популяции, или желаемое количество таких клеток в расчете на единицу массы тела субъекта, которому вводят эти клетки, например, клеток/кг. В некоторых аспектах, нужная доза составляет или превышает минимальное количество клеток определенной популяции и определенного подтипа или минимальное количество клеток популяции или подтипа в расчете на единицу массы тела.

[0830] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, дозу вычисляют исходя из желаемой фиксированной дозы всех клеток и нужного соотношения и/или исходя из нужной фиксированной дозы одной или более клеток, например, каждой клетки отдельных подтипов или субпопуляций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, дозу вычисляют исходя из нужной фиксированной или минимальной дозы Т-клеток и нужного соотношения CD4+ клеток и CD8+ клеток и/или исходя из нужной фиксированной или минимальной дозы CD4+ клеток и/или CD8+ клеток.

[0831] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки вводят в пределах или интервалах допустимого диапазона желаемого конечного соотношения множества клеточных популяций или подтипов, таких как CD4+ и CD8+ клеток или их подтипов. В некоторых аспектах, желаемое соотношение может представлять собой конкретное соотношение или интервал таких отношений. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения нужное соотношение (например, соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток) находится в пределах от или приблизительно от 5:1 до или приблизительно до 5:1 (или более, чем приблизительно 1:5 и менее чем приблизительно 5:1), или в пределах от или приблизительно от 1:3 до или приблизительно до 3:1 (или

более, чем приблизительно 1:3 и менее чем приблизительно 3:1), например, в пределах от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 1:5 (или более, чем приблизительно 1:5 и менее, чем приблизительно 2:1, и, например, оно равно или приблизительно равно 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9, 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 или 1:5. В некоторых аспектах, допустимое 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% нужного соотношения, включая любую величину в пределах этих интервалов.

[0832] В конкретных вариантах осуществления изобретения 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 клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

[0833] В некоторых аспектах размер дозы определяется на основе одного или нескольких критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например, химиотерапия, тяжесть заболевания у субъекта, такая как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, уровень или тип метастазирования, стадия и/или вероятность или возможность развития у субъекта токсических эффектов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина на введение клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

[0834] В некоторых вариантах осуществления изобретения способы также включают введение одной или более дополнительных доз клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), и/или лимфоистощающую терапию, и/или повторение одной или более стадий этих способов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одна или более дополнительных доз являются такими же, как начальная доза. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или более дополнительных доз отличаются от начальной дозы, и, например, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз или более превышают начальную дозу, или являются, например, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз или менее ниже, чем начальная доза. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение одной или более дополнительных доз зависит от реакции субъекта на первое лечение или ранее проводимое лечение, тяжести заболевания у субъекта, например, опухолевой нагрузки, объема, размера или степени, уровня или типа метастазирования, стадии и/или вероятности или возможности развития у субъекта токсических эффектов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина на введение клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

B. Ответ, эффективность и выживание

[0835] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, например, выходные клетки, полученные описанными здесь способами, например, как описано в Разделе-I, вводят субъекту, и он подвергается контролю в отношении ответа, выживания и/или признаков или симптомов токсичности.

[0836] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере у 35%, по меньшей мере у 40% или по меньшей мере у 50% субъектов, получавших лечение композициями клеток, например композициями терапевтических клеток, содержащих CAR+ CD4+ и CD8+ Т-клетки, имела место ремиссия (CR); и/или по меньшей мере у 50%, по меньшей мере у 60% или по меньшей мере у 70% субъектов, получавших лечение в соответствии с настоящим способом, достигают общего уровня реакции (ORR). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 50% субъектов, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60% субъектов, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 70% субъектов, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 80% субъектов или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 90% субъектов, получавших лечение в соответствии с настоящим способом, достигают CR и/или достигают целевой реакции (OR). В некоторых вариантах осуществления критерии, используемые для оценки эффективности лечения, включают общий уровень реакции (ORR), полный ответ (CR), продолжительность ответа (DOR), безпрогрессирующее выживание (PFS) и/или общее выживание (OS).

[0837] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере у 40% или по меньшей мере у 50% субъектов, получавших лечение в соответствии с настоящим способом, достигают полной ремиссии (CR), показывают безпрогрессирующее выживание (PFS) и/или общее выживание (OS) в течение периода времени большего, чем по меньшей мере или приблизительно 3 месяца, 6 месяцев или 12 месяцев; в среднем, субъекты, получавшие лечение в соответствии с настоящим способом, имеют медианное значение PFAS или OS в течение периода времени большего, чем по меньшей мере или приблизительно 6 месяцев, 12 месяцев или 18 месяцев и/или субъект имеет показатели PFS или OS после терапии по меньшей мере в течение 6, 12, 18 или более месяцев.

[0838] В некоторых вариантах осуществления изобретения безпрогрессирующее выживание (PFS), определяемое как продолжительность времени в течение и после лечения заболевания, такого как рак, субъекта живет без ухудшения состояния. В некоторых аспектах оценивается целевая реакция (OR), как измеряемый параметр реакции субъекта. В некоторых аспектах используется общий уровень реакции (ORR), представляющий собой долю субъектов, которые достигли CR или PR (частичной ремиссии). заболевания, такого как рак, субъекта живет без ухудшения состояния. В некоторых аспектах оценивается выживание (OS), представляющее собой продолжительность времени от даты диагностики или начала лечения заболевания, такого как рак, в течение которого субъекты, у которых диагностировано заболевание, такое как рак, еще живы. В некоторых аспектах оценивается бессобытийная выживаемость (EFS),

представляющая собой продолжительность времени после лечения рака, в течение которого у субъекта нет осложнений или проявлений, на предотвращения или лечение которых было направлено лечение. Эти события могут включать рецидив рака или начало проявления некоторых симптомов, таких как распространяющаяся боль в костях от рака или смерть.

[0839] В некоторых вариантах осуществления изобретения используется показатель длительности ответа (DOR), который включает время от зарегистрированного и подтвержденного ответа опухоли до прогрессирования заболевания. В некоторых вариантах осуществления показатель оценки ответа может включать длительность ответа, например ответа, который сохраняется в течение времени от начала терапии. В некоторых вариантах осуществления длительность ответа, используемая в качестве оценочного показателя реакции, составляет приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 или 24 месяца после начала лечения. В некоторых вариантах длительность ответа составляет более 3 месяцев или более 6 месяцев.

[0840] В некоторых вариантах осуществления изобретения введение дозы клеток или композиции клеток, полученных описанными здесь способами, снижает тяжесть заболевания или состояния, например, снижает количество опухолевых клеток, размер опухоли, увеличивает продолжительность выживания субъекта или бессобытийное выживание, в большей степени и/или в течение большего периода времени по сравнению показателями, которые наблюдаются у субъектов, подвергнутых лечению сравнимыми способами с использованием клеток, полученных альтернативным способом. В некоторых вариантах осуществления изобретения определяют, оценивают или измеряют тяжесть заболевания или состояние субъекта. В некоторых аспектах заболевание может быть обнаружено путем определения общего количества патологичных или связанных с заболеванием клеток, например опухолевых клеток, у субъекта или в органе, ткани или жидкости организма субъекта, такой как кровь или сыворотка. В некоторых аспектах оценивают выживание, выживание в течение определенного периода времени, степень выживания, наличие или продолжительность безрецидивного или бессимптомного выживания или безрецидивного выживания. В некоторых вариантах регистрируют и оценивают любой симптом заболевания или состояния. В некоторых вариантах определяют степень тяжести заболевания или тяжесть состояния субъекта.

[0841] В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень безрецидивного выживания или общая выживаемость субъекта повышена при введении клеток, полученных предлагаемыми способами, например способами, описанными в Разделе-I, по сравнению со случаем введения клеток, полученных альтернативными способами. Например, в некоторых вариантах осуществления уровень или вероятность безрецидивного выживания у субъектов, получавших лечение в соответствии со способами изобретения, через 6 месяцев после введения дозы, по меньшей мере больше или приблизительно больше 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%. В некоторых аспектах уровень общей выживаемости по меньшей мере больше или приблизительно

больше 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта, получавшего лечение клетками, полученными в соответствии со способами изобретения, безрецидивное выживание, бессобытийное выживание или выживание составляет по меньшей мере 6 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет. В некоторых вариантах изобретения улучшается время до начала прогрессирования заболевания развития улучшается, и оно составляет, например, по меньшей мере более или приблизительно более 6 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6,7,8, 9 или 10 лет.

[0842] В некоторых вариантах осуществления изобретения вероятность рецидива после лечения способом по изобретению уменьшается по сравнению с другими способами, например способами, где субъект получает клеточную терапию с использованием клеток, полученных альтернативными способами. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения вероятность рецидива через 6 месяцев после введения первой дозы меньше или приблизительно меньше на 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или приблизительно равна 10%.

C. Токсичность

[0843] В некоторых вариантах осуществления клетки, например, выходные клетки, полученные описанными здесь способами, например, способами, описанными в Разделе-I, вводят субъекту, и у субъекта контролируют признаки или симптомы токсичности.

[0844] В некоторых вариантах осуществления изобретения доза или композиция клеток, например, выходных клеток, полученных предлагаемыми способами, приводят к более низкому уровню и/или к более низкой степени токсичности, токсическому результату или симптому, профилю токсичности, фактору или проявлению, такому как симптом или проявление, связанное или указывающее на синдром высвобождения цитокина (CRS) или нейротоксичность, например, по сравнению со случаем альтернативной клеточной терапии с использованием композиции CAR+ Т-клеток, полученных альтернативным способом.

[0845] В некоторых вариантах осуществления изобретения введение клеток, полученных с помощью предлагаемых способов, не приводит к высокому уровню, степени или вероятности токсичности или токсических проявлений, или приводит в более низкому уровню, степени или вероятности токсичности или токсических проявлений, таких как нейротоксичность (NT), синдром высвобождения цитокина (CRS), по сравнению с некоторыми другими клеточными терапиями и/или в случае использования клеток, полученных альтернативными способами. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение клеток, например выходных клеток, полученных с помощью предоставленных способов, приводит или не увеличивает риска тяжелой NT (sNT), тяжелого CRS (sCRS), синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, лихорадке, с температурой по меньшей мере или приблизительно 38°C в течение трех или более дней, и уровню CRP в плазме, равный, по меньшей мере равный или приблизительно равный 20 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления изобретения

более или приблизительно более у 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60% или более субъектов, получивших лечение в соответствии с предлагаемыми способами, отсутствует CRS какой-либо степени или нейротоксичность какой-либо степени или класса. В некоторых вариантах осуществления не более чем у 50% субъектов, получивших лечение в соответствии с предлагаемыми способами (например по меньшей мере у 60%, 70%, 80%, 90% или более субъектов, получивших лечение), синдром высвобождения цитокинов (CRS) выше, чем CRS степени 2, и/или степень нейротоксичности более высокую, чем нейротоксичность степени 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере у 50% субъектов, получивших лечение в соответствии с предлагаемыми способами (например по меньшей мере у 60%, 70%, 80%, 90% или более субъектов, получивших лечение) нет тяжелых токсических проявлений (например, тяжелого CRS или тяжелой нейротоксичности), такой как нейротоксичность степени 3 или более высокой и/или нет тяжелого CRS, или они отсутствуют в течение определенного периода времени после лечения, например, в течение недели, двух недель или одного месяца после введения клеток. В некоторых вариантах показатели, оцениваемые для определения некоторых эффектов токсичности, включают неблагоприятные события (AE), лимитирующие дозу токсические эффекты (DIT), CRS и NT.

[0846] Проведение адоптивной Т-клеточной терапии, такой как лечение Т-клетками, экспрессирующими химерные рецепторы антигенов, может индуцировать токсические эффекты или проявления, такие как синдром высвобождения цитокинов и нейротоксичность. В некоторых примерах такие эффекты или проявления являются ассоциированными с высокими уровнями циркулирующих цитокинов, которые могут быть причиной наблюдаемой токсичности.

[0847] В некоторых аспектах токсическое проявление представляет собой синдром высвобождения цитокинов (CRS) или тяжелым CRS (sCRS), или такое проявление связано с ними или указывает на них. В некоторых случаях после адоптивной терапии Т-клетками и введения субъектам других биологических продуктов может иметь место CRS, например, sCRS. См. Davila et al. Sci Transl Med 6, 224ra25 (2014); Brentjens et al. Sci Transl. Med. 5, L77ra38 (2013); Grupp et al. N Engl. J Med. 368, 1509-1518 (2013); Kochenderfer et al. Blood 119, 2709-2720 (2012); и Xu et al. Cancer Letters 343 (2014) 172-708.

[0848] Обычно CRS вызывается гипериммунным системным ответом, опосредованным, например, Т-клетками, В-клетками, NK-клетками, моноцитами и/или макрофагами. Такие клетки могут высвобождать большое количество медиаторов воспаления, таких как цитокины и хемокины. Цитокины могут вызывать острую воспалительную реакцию и/или индуцировать повреждение эндотелиальных органов, что может привести к транссудации микрососудов, сердечной недостаточности или смерти. Тяжелый, угрожающий жизни CRS может привести к инфильтрации легких и повреждению легких, почечной недостаточности или диссеминированному внутрисосудистому свертыванию. Другие тяжелые, угрожающие жизни токсические

эффекты могут включать кардиотоксичность, респираторный дистресс, неврологическую токсичность и/или печеночную недостаточность.

[0849] CRS можно лечить с использованием методов противовоспалительной терапии, такой как терапия против IL-6, например с помощью анти-IL-6-антитела, например тоцилизумаба, или антибиотиков, или других известных агентов и средств. Результаты, признаки и симптомы CRS известны и включают те, которые описаны в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, где конкретный режим дозирования или введения влияют или не влияют на ассоциированные с CRS результаты, реакции или симптомы, то могут быть определены конкретные эффекты, признаки и симптомы и/или их количественные показатели или степени.

[0850] При введении CAR-экспрессирующих клеток CRS обычно проявляется через 6-20 дней после инфузии клеток, которые экспрессируют CAR (см. Xu et al. Cancer Letters 343 (2014) 172-78). В некоторых случаях CRS проявляется менее чем через 6 дней или более чем через 20 дней после введения CAR Т-клеток. Частота и время появления CRS могут быть связаны с базовым уровнем цитокинов или опухолевой нагрузкой на момент инфузии. Обычно CRS включает повышенные уровни интерферона-гамма (IFNϒ), фактора некроза опухоли-альфа (TNFα) и/или интерлейкина-2 (IL-2). Другие цитокины, которые могут быть быстро индуцированы при CRS, представляют собой IL-1B, IL-6, IL-8 и IL-10.

[0851] Обычные проявления, связанные с CRS, включают лихорадку, стеноз, озноб, гипотонию, одышку, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), энцефалопатию, изменение уровней ALT/AST, почечную недостаточность, сердечные расстройства, гипоксию, неврологические нарушения и смерть. Неврологические осложнения включают делирий, эпилепсиподобную активность, путанность сознания, затруднение речи, афазию и/или временную заторможенность. Другие патологические состояния, связанные с CRS, включают усталость, тошноту, головную боль, эпилептический приступ, тахикардию, миалгию, сыпь, синдром острой транссудации сосудов, нарушение функции печени и почечную недостаточность. В некоторых аспектах CRS ассоциирован с увеличением уровня одного или нескольких факторов, таких как сывороточный ферритин, d-димер, аминотрансфераза, лактатдегидрогеназа и триглицериды, или с гипофибриногенемией или гепатоспленомегалией.

[0852] Критерии CRS, которые, по-видимому, коррелируют с началом CRS для прогнозирования вероятности, что у субъекта может быть риск развития sCRS, известны (см. Davilla et al. Science translational medicine. 2014;6(224):224ra25). Эти факторы включают лихорадки, гипоксию, гипотензию, неврологические изменения, повышенные уровни воспалительных цитокинов в сыворотке, таких как набор из семи цитокинов IFNγ, IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и GM-CSF), повышение уровня которых при лечение повышение хорошо коррелирует как с опухолевой нагрузкой, так и симптомами sCRS. Известны и другие рекомендации по диагностике и лечению CRS (см. например, Lee et al, Blood. 2014;124(2):188-95). В некоторых вариантах осуществления критериями,

отражающими степень тяжести CRS, являются критерии, показанные ниже в Таблице 2.

Таблица 2: Типовые критерии оценки CRS

Степень	**Описание симптомов**
1 незначительная	Не опасные для жизни, требуют только симптоматического лечения с использованием, например, жаропонижающих и противорвотных средств (например, лихорадка, тошнота, усталость, головная боль, миалгия, недомогание)
2 умеренная	Требующие и отвечающие на умеренное вмешательство: • потребность в кислороде <40%, или • гипотония, чувствительная к жидкости или низкой дозе одного средства, повышающего давление, или • органная токсичность 2 степени (по CTCAE v4.0)
3 тяжелая	Требующие и отвечающие на активное вмешательство: • потребность в кислороде ≥ 40%, или • гипотония, требующая высокой дозы одного средства, повышающего давление (например, норадреналин ≥ 20 мкг/кг/мин, дофамин ≥ 10 мкг/кг/мин, фенилэфрин ≥ 200 мкг/кг/мин или адреналин ≥ 10мкг/кг/мин), или • гипотония, требующая нескольких средств, повышающих давление (например, вазопрессин+один из вышеперечисленных препаратов или комбинация средств, повышающих давление, эквивалентная ≥ 20 мкг/кг/мин норэпинефрина), или • органная токсичность 3 степени или трансаминит 4 степени (по CTCAE v4.0)
4 опасная для жизни	Угрожающие жизни: • потребность в вентилировании легких или • органная токсичность 4 степени (исключая трансаминит)
5 фатальная	Смерть

[853] В некоторых вариантах осуществления изобретения критерии отражающие степень тяжести CRS, являются такими, которые подробно описаны ниже в Таблице 3.

Таблица 3: Типовые критерии оценки CRS

Симптомы и проявления	**1 степень (незначи-тельная)**	**2 степень (умеренная)**	**3 степень (тяжелая)**	**4 степень (опасная для жизни)**

	Степень CRS определяется по наиболее тяжелому симптому (исключая жар)			
Температура ≥38,5°C или ≥101,3°F	Любые	Любые	Любые	Любые
Систоличес-кое артериаль-ное давле-ние ≤ 90 мм рт. ст.	N/A	Ответ на жидкость или одно средство, повышающее давление в низкой дозе	Требуется высокая доза или многократное введение средства, повышающего давление	Угроза жизни
Потребность в кислороде для достижения $SaO_2 > 90\%$	N/A	$FiO_2 < 40\%$	$FiO_2 \geq 40\%$	Требуется вентиляция легких
Органная токсичность	N/A	2 степень	3 степень или трансаминит	4 степень (исключая трансаминит)

N/A - неприменимо

[0854] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения считается, что у субъекта развивается «тяжелый CRS» в ответ на введение или вторичное введение клеток или дозы клеток, если после введения у субъект наблюдаются: (1) лихорадка с температурой по меньшей мере 38 градусов Цельсия в течение по меньшей мере трех дней; (2) повышение цитокинов, которое включает либо (a) максимальное изменение по меньшей мере в 75 раз для по меньшей мере двух цитокинов из следующей группы семи цитокинов, по сравнению с уровнем интерферона гамма (IFNγ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5 непосредственно после введения, и/или (b) максимальное изменение кратности по меньшей мере в 250 раз для по меньшей мере одного цитокина из следующей группы семи цитокинов, интерферона гамма (IFNγ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5 непосредственно после введения; и (c) по меньшей мере, один клинический признак токсичности, такой как гипотония (необходим по меньшей мере одно внутривенное введение средства, повышающего давление) или гипоксия ($PO_2 < 90\%$) или наличие одного или более неврологических нарушений (включая изменения психического статуса, помутнение сознания и/или припадки). В некоторых вариантах осуществления тяжелый CRS включает CRS степени 3 или выше, как указано в Таблице 2

или Таблице 3.

[0855] В некоторых вариантах осуществления изобретения проявления, связанные с тяжелой CRS или CRS степени 3 или более, или CRS степени 4 или более, включают одно или несколько из: постоянной лихорадки, например, лихорадки со специфической температурой, например, более или приблизительно более 38°C, в течение двух или более, например, трех или более, например, четырех или более дней или в течение по меньшей мере трех последовательных дней; лихорадки с температурой более или приблизительно более 38°C; повышение уровня цитокинов с максимальным изменением уровня меньшей мере приблизительно в 75 раз по сравнению с уровнем до лечения для по меньшей мере двух цитокинов (например по меньшей мере двух цитокинов из группы, состоящей из интерферона гамма (IFNγ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5, и/или фактора некроза опухоли альфа (TNFα), или максимальное изменение уровня меньшей мере приблизительно в 250 раз по сравнению с уровнем до лечения одного из указанных цитокинов; и/или по меньшей мере одно клиническое проявление токсичности, такой как гипотония (например, требующей по меньшей мере одного внутривенного введения средства, повышающего давление); гипоксии (например, уровень кислорода в плазме (PO_2) менее 90%); и/или одного или нескольких неврологических нарушений (включая изменения психического статуса, помутнение сознания и/или припадки). В некоторых вариантах осуществления тяжелый CRS включает CRS, который требует лечения или пребывания в блоке интенсивной терапии (ICU).

[0856] В некоторых вариантах осуществления CRS, такой как тяжелый CRS, включает комбинацию: (1) персистирующей лихорадки (лихорадки с температурой по меньшей мере 38 градусов Цельсия в течение по меньшей мере трех дней), и (2) уровня CRP в сыворотке по меньшей мере приблизительно 20 мг/дл или приблизительно 20 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления CRS включает гипотензию, требующую применения двух или более средств повышающих давление, или респираторных проявлений, требующих механической вентиляции легких. В некоторых вариантах осуществления дозировка средств, повышающих давление, или сосудосуживающих средств увеличивают при втором или последующих введениях.

[0857] В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелый CRS или CRS степени 3 включает увеличение аланинаминотрансферазы, увеличение аспартатаминотрансферазы, озноб, фебрильную нейтропению, головную боль, дисфункции левого желудочка, энцефалопатию, гидроцефалию и/или тремор.

[0858] Способы измерения или обнаружения различных проявлений могут быть различными из числа известных.

[0859] В некоторых аспектах изобретения токсичное проявление является или связано с нейротоксичностью. В некоторых вариантах симптомы, связанные с клиническим риском нейротоксичности, включают путанность сознания, делирий, афазию речи, заторможенность, миоклонию, летаргию, измененное умственное состояние, судороги, эпилептическую активность, припадки (необязательно подтвержденную

электроэнцефалограммой [EEG]), повышенные уровни бета-амилоида (Aβ), повышенные уровни глутамата и повышенные уровни кислородных радикалов. В некоторых вариантах осуществления изобретения нейротоксичность классифицируется на основе тяжести состояния (например, с использованием шкалы из степеней 1-5) (см., например, Guido Cavaletti & Paola Marmiroli Nature Reviews Neurology 6, 657-666 (December 2010); National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria version 4.03 (NCI-CTCAE v4.03).

[0860] В некоторых случаях неврологические симптомы могут представлять собой ранние симптомы sCRS. В некоторых вариантах неврологические симптомы начинают проявляться через 5-7 дней после терапии или инфузии клеток. В некоторых вариантах продолжительность неврологических изменений может сохраняться в течение 3-19 дней. В некоторых случаях восстановление неврологических изменений происходит после устранения или завершения других симптомов sCRS. В некоторых вариантах осуществления изобретения устранение неврологических изменений или снижения их степени не происходит при лечении, направленном против IL-6, и/или при лечении стероидом (стероидами).

[0861] В некоторых вариантах осуществления изобретения предполагается, что у субъекта развивается тяжелая нейротоксичность в ответ на введение или вторичное введение клеток для клеточной терапии или дозы клеток, если после введения у субъекта проявляются симптомы, которые ограничивают возможности самообслуживания (например, купания, одевания и раздевания, приема пищи, пользование туалетом, прием лекарств) из числа: 1) симптомов периферической двигательной невропатии, включая воспаление или дегенерацию периферических двигательных нервов; 2) симптомы периферической сенсорной нейропатии, включая воспаление или дегенерацию периферических сенсорных нервов, дизестезию, такую как искажение сенсорного восприятия, приводящее к анормальным и неприятным ощущениям, невралгию, такую как интенсивное болезненное ощущение вдоль нерва или группы нервов, и/или парестезии, такие как функциональные нарушения сенсорных нейронов, приводящие к аномальным ощущениям покалывания кожи, онемения, давления, холода и тепла в отсутствие стимула. В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая нейротоксичность включает нейротоксичность уровня 3 или выше, как указано в Таблице 4.

Таблица 4: Типовые критерии оценки нейротоксичности

Уровень	**Описание симптомов**
1 Бессимптомная или незначительная	Легкие симптомы или отсутствие симптомов
2 Умеренная	Наличие симптомов, которые ограничивают инструментальную активность в повседневной жизни (ADL), такую как приготовление еды, покупка продуктов или одежды, использование телефона, управление деньгами

3 Тяжелая	Наличие симптомов, ограничивающих ADL самообслуживания, таких как купание, одевание и раздевание, самостоятельный прием пищи, пользование туалетом, прием лекарств
4 Опасная для жизни	Симптомы, которые опасны для жизни и требуют срочного вмешательства
5 Фатальная	Смерть

[0862] В некоторых вариантах осуществления способы снижают тяжесть симптомов, связанных с CRS или нейротоксичностью, по сравнению с другими способами. В некоторых аспектах предложенные способы уменьшают тяжесть симптомов, их проявления или факторы, связанные с CRS, включая симптомы, результаты или факторы, связанные с тяжелым CRS или CRS степени 3 или более, по сравнению с другими способами. Например, субъекты, получившие лечение в соответствии с настоящими способами, могут не иметь симптомов CRS и/или иметь симптомы CRS с более низкой тяжестью, проявлениями или факторами CRS, например тяжелого CRS или CRS степени 3 или более высокой степени, из числа любых, описанных, например, в Таблице 2 или Таблице 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъектов, получивших лечение в соответствии с настоящими способами, могут проявляться более слабые симптомы нейротоксичности, такие как слабость или онемение конечностей, потеря памяти, зрения и/или интеллекта, неконтролируемое навязчивое и/или компульсивное поведение, бред, головная боль, снижение когнитивных способностей и поведенческие проблемы, включая потерю двигательного контроля, ухудшение когнитивных функций, дисфункцию вегетативной нервной системы и сексуальную дисфункцию, по сравнению с субъектами, которые получили лечение другими способами. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъектов, которых лечили в соответствии с заявленными способами, могут проявляться в меньшей степени симптомы, связанные с периферической моторной невропатией, периферической сенсорной невропатией, дизетезией, невралгией или парестезией.

[0863] В некоторых вариантах осуществления изобретения введение клеток, полученных с помощью предлагаемых способов, уменьшает проявления, связанные с нейротоксичностью, включая повреждения нервной системы и/или мозга, такие как гибель нейронов. В некоторых аспектах способы снижают уровень факторов, связанных с нейротоксичностью, таких как бета-амилоид (Aβ), глутамат и кислородные радикалы.

[0864] В некоторых вариантах осуществления изобретения одно или несколько вмешательств или введений средств лечения токсичности, таких как терапия, направленная на снижение/устранение токсичности, осуществляют в момент времени, при котором или непосредственно после которого у субъекта возникает или диагностируют (например, сначала определяют или подтверждают) продолжительную лихорадку,

например, как указано выше в соответствии с любым из вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления изобретения одно или несколько лекарственных средств, направленных против токсичности или на снижение токсичности, вводят в течение определенного периода времени после проявления или его подтверждения, например, в течение 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 6 часов или 8 часов.

V. КОМПОЗИЦИИ И ПРЕПАРАТЫ

[0865] Также предлагаются композиции и препараты, содержащие сконструированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, полученные описанными здесь способами. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции и препараты содержащие клетки, представляют собой композиции или препараты клеток, полученных описанными здесь способами, например в Разделе I. В некоторых вариантах осуществления композиции и препараты представляют собой или содержат выходные композиции клеток, и к ним необязательно прилагаются инструкции для использования, например, инструкции для введения сконструированных клеток субъекту, например, описанными здесь способами, такими, как описанными в Разделе III.

[0866] В некоторых вариантах осуществления изобретения доза клеток, содержит клетки, сконструированные с рекомбинантным антигенным рецептором, например CAR или TCR, и эта доза представлена в виде композиции или препарата, например в виде фармацевтической композиция или препарата. В некоторых вариантах осуществления доза содержит клетки описанной здесь выходной композиции, как описано как в Разделе I-G. В конкретных вариантах осуществления изобретения доза содержит клетки, которые были получены способом, описанным в настоящем документе, например, в Разделе I. Такие композиции могут быть использованы в соответствии с предлагаемыми способами и/или в составе изделий или композиций, направленных на предотвращение или лечение заболеваний, состояний и расстройств, или в способах их обнаружения, диагностики и прогнозирования.

[0867] Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечить эффективную биологическую активность активного ингредиента, содержащегося в нем, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому должен быть введен препарат.

[0868] «Фармацевтически приемлемый носитель» представляет собой ингредиент в фармацевтической композиции, отличный от активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, без ограничения буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

[0869] В некоторых аспектах выбор носителя частично определяется конкретной клеткой или агентом и/или способом введения. Соответственно, существует множество вариантов подходящих препаратов. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. В некоторых

аспектах используется смесь двух или более консервантов. Консервант или их смеси, как правило, присутствуют в количестве от приблизительно 0,0001% до приблизительно 2% от общего веса композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители, как правило, нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают, но без ограничения ими, буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0870] В некоторых аспектах буферные агенты включены в композиции. Подходящие буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах используется смесь двух или более буферных агентов. Буферный агент или их смеси обычно присутствуют в количестве от приблизительно 0,001% до приблизительно 4% от общей массы композиции. Способы приготовления вводимых фармацевтических композиций известны. Приводимые в качестве примера способы описаны более подробно, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21-st ed (May 13 2005).

[0871] Композиция или препарат может содержать более одного активного ингредиента, применимого для конкретного показания, заболевания или состояния, которые предотвращаются или лечат клетками или агентами, где соответствующие активности не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Такие активные ингредиенты присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для данного назначения или цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно включает другие фармацевтически активные агенты или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические агенты, например, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.п. В некоторых вариантах осуществления агенты или клетки вводят в форме соли, например,

фармацевтически приемлемой соли. Подходящими фармацевтически приемлемыми кислотно-аддитивными солями являются соли минеральных кислот, таких как соляная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, и органических кислот, таких как винная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, фумаровая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная и арилсульфоновая кислоты, например, п-толуолсульфоновая кислота.

[0872] Фармацевтическая композиция или препарат в некоторых вариантах осуществления содержит клетки в количествах, эффективных для лечения или предупреждения заболевания или состояния, такого как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическая или профилактическая эффективность в некоторых вариантах осуществления контролируют путем периодического обследования и оценки субъектов. В случае повторных введений в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет желательное подавление симптомов заболевания. Однако другие схемы введения доз могут применяться и могут быть определены. Желательная доза может быть доставлена путем однократного болюсного введения композиции, путем многократных болюсных введений композиции или путем непрерывного инфузионного введения композиции.

[0873] Препараты или клетки можно вводить любым подходящим способом, например болюсной инфузией, инъекцией, например внутривенными или подкожными инъекциями, внутриглазной инъекцией, периокулярной инъекцией, субретинальной инъекцией, инъекцией в стекловидное тело, транс-септальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, внутрихориоидальной инъекцией, интракамерной инъекцией, субконъюнктивальной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перибульбарной инъекцией или инъекцией в заднюю слизисто-склеральную область. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют парентерально, внутрилегочным и интраназальным путем, и, если желательно, для местного лечения осуществляют внутрипросветное введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах заданную дозу клеток или препарата вводят путем однократного болюсного введения. В некоторых вариантах осуществления введение клеток или препарата осуществляют путем многократного болюсного введения, например, в течение не более чем 3 дней, или путем непрерывного введения клеток или препарата инфузией.

[0874] Для предотвращения или лечения заболевания подходящая доза может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, независимо от того, введены ли клетки в профилактических или терапевтических целях, от предшествующей терапии, клинической истории субъекта и его реакции на клетки, а также с учетом мнения и по усмотрению лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления композиции и клетки вводят

подходящим образом субъекту одновременно или в виде серии введений.

[0875] Клетки или препараты могут быть введены стандартными методами введения, с использованием обычных средств и/или устройств. Для хранения и введения композиций используются препараты и устройства, такие как шприцы и флаконы. Вводимые клетки могут быть аутологичными или гетерологичными. Так, например, иммуночувствительные клетки или клетки-предшественники могут быть взяты у одного субъекта и введены этому же субъекту или другому совместимому субъекту. Иммуночувствительные клетки или их потомство, происходящее из периферической крови (например, полученные in vivo, ex vivo или in vitro), могут быть введены посредством локальной инъекции, включая введение с помощью катетера, системную инъекцию, локализованную инъекцию, внутривенную инъекцию или парентеральное введение. При введении терапевтической композиции (например, фармацевтической композиции, содержащей генетически модифицированные иммуночувствительные клетки или агенты, которые способствуют лечению или ослаблению симптомов нейротоксичности), такую композицию обычно готовят в виде единичной инъецируемой дозы (раствора, суспензии, эмульсии).

[0876] Композиции по изобретению являются композиции для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, пульмонарного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, трансбуккального, сублингвального введения или введения в виде суппозиториев. В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию, препарат или клеточные популяции вводят парентерально. Используемый здесь термин «парентеральный» включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию, препарат или клеточные популяции вводят субъекту посредством периферической системной доставки путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

[0877] В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции предоставлены в виде стерильных жидких препаратов, например изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые в некоторых аспектах могут быть забуферены до выбранного pH. Жидкие препараты обычно легче приготовить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции удобнее вводить, особенно путем инъекции. Вязкие композиции, с другой стороны, могут быть приготовлены в пределах необходимого диапазона вязкости, чтобы обеспечить более длительные периоды контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

[0878] Стерильные растворы для инъекций могут быть получены включением препарата, композиции или клеток в растворитель, такой как в смеси с подходящим

носителем, разбавителем или эксципиентом, таким как стерильная вода, физиологический солевой раствор, глюкоза, декстроза и т.п.

[0879] Композиции, которые должны использоваться для введения in vivo, обычно являются стерильными. Стерильность может быть легко достигнута, например, фильтрацией через стерильные фильтрационные мембраны.

VI. ИЗДЕЛИЯ И НАБОРЫ

[0880] Также предлагаются изделия и наборы, содержащие сконструированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, полученный описанными здесь способами. В некоторых вариантах осуществления изделия содержат клетки, например композицию или дозу клеток, полученных описанными здесь способами, в частности, в Разделе I. В некоторых вариантах осуществления наборы и/или изделия содержат выходные композиции клеток и необязательно инструкции для использования, например, инструкции для введения сконструированных клеток субъекту, например, описанными здесь способами, в частности, в Разделе III.

[0881] В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных здесь, представляют собой изделия и/или наборы, которые включают композицию, содержащую терапевтически эффективное количество любых сконструированных клеток, описанных в настоящем описании, и инструкции для введения субъекту для лечения заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления изобретения инструкции могут определять некоторые или все стадии способов введения клеток, которые описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения инструкции содержат конкретные инструкции для введения клеток для клеточной терапии, например дозы, временные показатели, порядок выбора и/или идентификации субъектов для введения и условия для введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения изделия и/или наборы дополнительно содержат средство для лимфоистощающей терапии и, необязательно, дополнительно включает инструкции по проведению лимфоистощающей терапии. В некоторых вариантах осуществления инструкции могут быть включены в качестве этикетки или вкладыша в упаковку, в которой размещены композиции для введения.

[0882] В некоторых вариантах осуществления изделие может включать контейнер, необязательно сосуд, с композицией, содержащей CD4+ и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления изделие или набор содержит композицию клеток с соотношением CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 3:1 до 1:3, от 2,5:1 до 1:2,5, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,4:1 до 1:1,4, от 1,3:1 до 1:1,3, от 1,2:1 до 1:1,2, или от 1,1:1 до 1:1,1. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток равное или приблизительно равное 3:1, 2,8:1, 2,5:1, 2,25:1, 2:1, 1,8:1, 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, 1:1,8, 1:2, 1:2,25, 1:2,5, 1:2,8 или 1:3. В конкретных вариантах осуществления изобретения изделие или набор включают композицию клеток с соотношением CD4+ Т-клеток, которые экспрессируют

рекомбинантный рецептор, например CAR, и CD8+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например CAR, от 3:1 и 1:3, от 2,5:1 до 1:2,5, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,4:1 до 1:1,4, от 1,3:1 до 1:1,3, от 1,2:1 до 1:1,2 или от 1,1:1 до 1:1,1. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция клеток имеет соотношение CD4+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например CAR, и CD8+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например CAR, равное или приблизительно равное 3:1, 2,8:1, 2,5:1, 2,25:1, 2:1, 1,8:1, 1,6:1, 1,5:1:1, 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, 1:1,8, 1:2, 1:2,25, 1:2,5, 1:2,8 или 1:3.

[0883] В некоторых вариантах осуществления изобретения в инструкции определена доза клеток, подлежащих введению. Например, в некоторых вариантах осуществления в инструкции указана доза, которая включает все клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор (например, CAR), составляющая от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 3×10^8, например, в интервале от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до 2×10^8 всех таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя из вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят множество доз, и каждая из доз или общая доза может находиться в любом из указанных выше интервалов значений.

[0884] В некоторых вариантах осуществления изобретения контейнер, такой как флакон или ампула, содержит боле или приблизительно более 10×10^6 Т-клеток или Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, более или приблизительно более 15×10^6 Т-клеток или Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, более или приблизительно более 25×10^6 Т-клеток, или Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы. В некоторых аспектах изобретения флакон/ампула содержит от или приблизительно от 10 миллионов клеток на мл до или приблизительно до 70 миллионов клеток на мл, от или приблизительно от 10 миллионов клеток на мл до или приблизительно до 50 миллионов клеток на мл, от или приблизительно от 10 миллионов клеток на мл до или приблизительно до 25 миллионов клеток на мл, от или приблизительно от 10 миллионов клеток на мл до или приблизительно до 15 миллионов клеток на мл, от или приблизительно от 15 миллионов клеток на мл до или приблизительно до 70 миллионов клеток на мл, от или приблизительно от 15 миллионов клеток на мл до или приблизительно до 50 миллионов клеток на мл, от приблизительно 15 миллионов клеток на мл до приблизительно 25 миллионов клеток на мл, от приблизительно 25 миллионов клеток на мл до или приблизительно до 70 миллионов клеток на мл, от приблизительно или приблизительно 25 миллионов клеток на мл до приблизительно 50 миллионов клеток на мл и от приблизительно 50 миллионов клеток на мл до приблизительно 70 миллионов клеток на мл.

[0885] В некоторых вариантах осуществления множество флаконов или множество клеток или единичная доза клеток, указанных для введения, вместе включают дозу клеток, составляющую от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно 5×10^8 всех Т-клеток или всех Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, от или

приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до 1×10^9 всех Т-клеток или всех Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, от или приблизительно от 5×10^5 до или приблизительно до 1×10^9 всех Т-клеток или всех Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 1×10^{10} всех Т-клеток или всех Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, каждая включительно. В некоторых аспектах изделие содержит одну или несколько единичных доз CD4+ и CD8+ Т-клеток или CD4+ рецептор+ Т-клеток и CD8+ рецептор+ Т-клеток, где единичная доза составляет от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до 2×10^8 рекомбинантных рецептор-экспрессирующих Т-клеток, или от или приблизительно от 5×10^7 до или приблизительно до $1{,}5 \times 10^8$ рекомбинантных рецептор-экспрессирующих Т-клеток, или приблизительно 5×10^7 рекомбинантных рецептор-экспрессирующих Т-клеток, приблизительно 1×10^8 рекомбинантных рецептор-экспрессирующих Т-клеток или приблизительно $1{,}5 \times 10^8$ рекомбинантных рецептор-экспрессирующих Т-клеток, необязательно, где информация в инструкции конретизирует порядок введения одной или множества единичных доз и/или объем, соответствующий одной или множеству единичных доз.

[0886] В некоторых вариантах в инструкциях могут быть указаны режим дозирования и сроки введения. Например, в некоторых вариантах осуществления инструкция может содержать указания о введении субъекту множества доз клеток, например двух или более доз. В некоторых вариантах в инструкции указывается время введения нескольких доз, например, что вторая доза вводится приблизительно через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день после введения первой дозы; и/или количество доз в каждой дозе.

[0887] В некоторых вариантах осуществления изобретения в инструкции указана доза, количество клеток или тип клеток и/или соотношение типов клеток, например, отдельных популяций или подтипов, такие как соотношение CD4+ и CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения указываются популяции или подтипы клеток, такие как CD8+ и CD4+ Т-клеток. Например, в некоторых вариантах в инструкции указано, что клетки вводят при или в пределах допустимого диапазона соотношения клеточных популяций или подтипов клеток, таких как CD4+ и CD8+ Т-клеток, где такой диапазон составляет от или от приблизительно от 5:1 до или приблизительно до 5:1 (или приблизительно более 1:5 и приблизительно менее 5:1), или от или приблизительно от 1:3 до или приблизительно до 3:1 (или приблизительно более 1:3 и приблизительно менее 3:1), например, от или приблизительно от 2:1 до или приблизительно до 15 (или приблизительно более 1:5 и приблизительно менее 2:1), и, например, указано, что соотношение равно или приблизительно равно 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1:1, 1:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9:1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 или 1:5. В некоторых вариантах в инструкции указано, что композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в нужном соотношении и вводят субъекту в виде единой

композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения инструкция содержит указания, что композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток вводят в виде отдельных композиций в желаемом соотношении. В некоторых аспектах допустимое различие в соотношении находится 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% от требуемого значения соотношения, включая любое значение внутри этих диапазонов.

VII. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0888] Кроме особо оговоренных случаев, все термины, обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемые здесь, как предполагается, имеют то же значения, в котором они обычно понимаются специалистом со средним уровнем компетентности в области техники, к которой относится заявленный объект изобретения. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены здесь для внесения ясности и/или для удобства ссылки, и включение сюда таких определений необязательно должно истолковываться как то, что они представляют существенную разницу по сравнению с тем, что обычно подразумевается в данной области техники.

[0889] Как используется здесь, формы в единственном числе включают также формы во множественном числе, если контекст четко не диктует иное. Например, формы, представленные в единственном числе, эквивалентны указаниям «по меньшей мере один» или «один или несколько». Понятно, что в описанных здесь аспектах и вариантах указание «включает» или «содержит» взаимозаменяемо с указанием «по существу состоит».

[0890] В настоящем описании различные аспекты заявленного изобретения представлены с использованием формата диапазонов. Следует понимать, что описание с использованием формата диапазонов представлено только для удобства и краткости описания изобретения, и оно не должно истолковываться ограничение объема заявленного изобретения. В соответствии с этим, описание диапазонов и интервалов следует рассматривать как конкретное раскрытие всех возможных признаков и показателей внутри этих интервалов, включая подинтервалы, а также отдельных значений в этих интервалах. Так, например, если указан интервал величин, то следует понимать, что каждое промежуточное значение между верхним и нижним пределом этого интервала и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном интервале охватывается изобретением. Верхние и нижние пределы этих меньших интервалов могут быть независимо включены в меньшие интервалы и также охватываются заявленным изобретением с учетом любого конкретно исключенного предела или признака в указанном интервале. Если указанный интервал включает один или оба предела, то интервалы, исключающие любой или оба из этих включенных пределов, также включены в заявленное изобретение. Этот подход применяется независимо от широты

интервала/диапазона.

[0891] Термин «приблизительно», используемый в данном описании, относится к обычному интервалу ошибок для соответствующего значения, хорошо известного специалисту в данной области техники. Ссылка на «приблизительное» значение или параметр в данном описании включает (и описывает) варианты, относящиеся к этому значению или параметру per se. Например, указание, представленное как «приблизительно X» включает указание конкретного определения значения «X».

[0892] Как используется здесь, выражение, что положения нуклеотидов или аминокислот «соответствуют» положениям нуклеотидов или аминокислот в раскрытой последовательности, например, определенной в Списке последовательностей, относится к положениям нуклеотидов или аминокислот, определенным при совмещении с раскрытой последовательностью для максимизации процента идентичности, используя стандартный алгоритм совмещения, такой как алгоритм GAP. Совмещая последовательности, можно идентифицировать соответствующие остатки, например, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве направляющих. В общем, для определения соответствующих положений последовательности аминокислот совмещают так, чтобы получить соответствие наивысшего порядка (смотрите, 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).

[0893] Термин "вектор", используемый здесь, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножать другую нуклеиновую кислоту, к которой она присоединена. Термин охватывает векторы, которые являются самореплицирующейся структурой нуклеиновой кислоты, а также вектор, включающийся в геном клетки-хозяина, в который он введен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы упоминаются здесь как «экспрессирующие векторы». В качестве векторов могут быть вирусные векторы, такие как ретровирусные векторы, например, гамма-ретровирусные и лентивирусные векторы.

[0894] Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, в том числе потомству таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первичную трансформированную клетку и ее потомство, независимо от числа пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным по содержанию нуклеиновых кислот с родительской клеткой, но может содержать мутации. Сюда включено мутантное потомство, которое имеет ту же функцию или биологическую активность, что и функция или биологическая активность, в отношении которой проводится скрининг или отбор, у

первоначально трансформированной клетки.

[0895] Указание, используемое в данном описании, что клетка или популяция клеток являются «позитивными» или «+» по конкретному маркеру, означает детектируемое присутствие на клетке или в клетке конкретного маркера, обычно маркера клеточной поверхности. Если речь идет о поверхностном маркере, то этот термин означает детектируемое экспрессию на поверхности, детектируемое, в некоторых вариантах изобретения с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и детектирования указанного антитела, где такое окрашивание обнаруживается с помощью проточной цитометрии на уровне, значительно превышающем окрашивание, детектируемое с помощью той же самой процедуры, но в присутствии контроля соответствующего изотипа при всех прочих равных условиях, и/или на уровне, по существу, аналогичном уровню для клеток, которые, как известно, являются позитивными по маркеру, и/или на уровне, значительно превышающем уровень для клеток, которые, как известно, являются негативными по маркеру.

[0896] Указание, используемое в данном описании, что клетка или популяция клеток являются «негативными» по конкретному маркеру, означает отсутствие какого-либо детектируемого присутствия на клетке или в клетке конкретного маркера, обычно маркера клеточной поверхности. Если речь идет о поверхностном маркере, то этот термин означает отсутствие поверхностной экспрессии, детектируемое, в некоторых вариантах осуществления, с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и детектирования указанного антитела, где такое окрашивание не обнаруживается с помощью проточной цитометрии на уровне, значительно превышающем окрашивание, детектируемое с помощью той же самой процедуры, но в присутствии контроля соответствующего изотипа при всех прочих равных условиях, и/или на уровне, который, по существу, значительно ниже для клеток, которые, как известно, являются позитивными по маркеру, и/или на уровне, в основном, аналогичном уровню для клеток, которые, как известно, являются негативными по маркеру.

[0897] Используемый здесь термин «процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей» и «процент идентичности», если он относится к аминокислотной последовательности (эталонной полипептидной последовательности), определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате (например, антитела или его фрагмента), которые являются идентичными аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, которые известны специалистам в данной области, например, с

использованием общедоступных компьютерных программ, таких как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалист в данной области может самостоятельно определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

[0898] Замена аминокислоты может включать замену одной аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой. Замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену. Замены аминокислот могут быть введены в связывающую молекулу, например антитело, представляющую интерес, и продукты, подвергаемые скринингу на желательную активность, например сохраненное/улучшенное связывание антигена, пониженную иммуногенность или улучшенную ADCC или CDC.

[0899] Аминокислоты обычно могут быть сгруппированы в соответствии со следующими общими свойствами боковой цепи:

(1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) кислые: Asp, Glu;

(4) основные: His, Lys, Arg;

(5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;

(6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0900] В некоторых вариантах осуществления консервативные замены могут включать замену члена одного из этих классов на другого члена того же класса. В некоторых вариантах осуществления неконсервативные аминокислотные замены могут включать замену члена одного из этих классов на другой класс.

[0901] Используемый здесь термин «композиция» означает любую смесь из двух или более продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Композиция может представлять собой раствор, суспензию, жидкость, порошок, пасту, водную, безводную или любую их комбинацию.

[0902] Используемый здесь термин «субъект» обозначает собой млекопитающее, такое как человек или другое животное, и, как правило, он относится к человеку.

[0903] Если не определено иначе, все термины, используемые в данной области, обозначения и другие технические и научные термины, определения или терминология, используемые в данном описании, имеют значение, которое обычно используется специалистами в данной области техники, к которой относится заявленное изобретение. В некоторых случаях термины, имеющие обычные значения, определены здесь для ясности и/или для удобства восприятия, и включение таких определений не обязательно должно быть истолковано как представляющее существенную разницу по сравнению с тем, что обычно известно в данной области техники.

VIII. ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0904] В рамках вариантов осуществления изобретения представлено следующее:

1. Способ получения композиции сконструированных клеток, где способ включает:

(a) объединение композиции CD4+ Т-клеток и композиции CD8+ Т-клеток в соотношении CD4+ и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, получая тем самым входную композицию;

(b) инкубирование входной композиции при стимулирующих условиях, получая тем самым стимулированную композицию, где указанные условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул;

и где входная композиция содержит по меньшей мере 100×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл.

2. Способ по п.1, где CD4+ и CD8+ клетки во входной композиции обогащают или отбирают из первичной пробы от субъекта, где необязательно CD4+ и CD8+ клетки во входной композиции отдельно обогащают или отбирают из первичной пробы, полученной от субъекта.

3. Способ по п. 1 или 2, где композиция CD4+ Т-клеток включает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% CD4+ Т-клеток.

4. Способ по п. 1 или 2, где композиция CD8+ Т-клеток включает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% CD8+ Т-клеток.

5. Способ получения композиции сконструированных клеток, где способ включает инкубирование входной композиции в условиях стимуляции, получая тем самым стимулированную композицию, где:

входная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, и где входная композиция содержит по меньшей мере 100×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл; и

условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где инкубирование осуществляют в бессывороточной среде.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где входная композиция содержит по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток, которые представляют собой CD4+ Т-клетки или CD8+ Т-клетки.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где входная композиция содержит от 100×10^6 до 500×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где входная композиция содержит или приблизительно содержит 300×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток.

10. Способ по п.9, где все CD4+ и CD8+ Т-клетки являются жизнеспособными клетками.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где входная композиция имеет концентрацию от 1×10^6 клеток/мл до 5×10^6 клеток/мл.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где входная композиция имеет концентрацию равную или приблизительно равную 3×10^6 клеток/мл.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где входная композиция имеет соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток от 1,5:1 до 1:1,5.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где входная композиция имеет соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток от 1,2:1 до 0,8:1.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где входная композиция имеет соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток равное или приблизительно равное 1:1.

16. Способ по любому из пп. 1-15, где входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CD45RA и CCR7.

17. Способ по п.16, где соотношение CD4+ клеток, поверхностно-положительных по CD45RA и CCR7, и CD8+ клеток, поверхностно-положительных по CD45RA и CCR7, равно или приблизительно равно 1,1:1.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CD27 и CCR7.

19. Способ по п.18, где соотношение CD4+ клеток, поверхностно-положительных по CD27 и CCR7, и CD8+ клеток, поверхностно-положительных по CD27 и CCR7, равно или приблизительно равно 1,69:1.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CCR7 и поверхностно-негативными по CD62L, необязательно в соотношении от 2,0:1 до 1,5:1.

21. Способ по любому из пп. 1-20, дополнительно включающий:

введение рекомбинантного рецептора в клетки из стимулированной композиции, в результате чего получают сконструированную композицию клеток, где введение включает приведение клеток стимулированной композиции в контакт с агентом, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

22. Способ по п.21, где:

контактирование осуществляют путем трансфекции вектором, где вектор представляет собой транспозон, необязательно, транспозон Sleeping Beauty (SB) или транспозон Piggybac; или

контактирование осуществляют путем трансдукции вирусным вектором.

23. Способ по любому из пп. 1-22, дополнительно включающий:

введение рекомбинантного рецептора в клетки стимулированной композиции, в результате чего получают сконструированную композицию клеток, где введение включает

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

24. Способ по любому из пп. 21-23, где введение осуществляют в бессывороточной среде.

25. Способ по любому из пп. 21-24, где используемая для введения стимулируемая композиция содержит менее 300×10^6 клеток.

26. Способ по любому из пп. 21-25, где используемая для введения стимулируемая композиция содержит от 50×10^6 до 200×10^6 клеток.

27. Способ по любому из пп. 21-26, где используемая для введения стимулируемая композиция содержит или приблизительно содержит 100×10^6 клеток.

28. Способ по любому из пп. 21-27, где используемая для введения стимулируемая композиция имеет концентрацию менее 3×10^6 клеток/мл.

29. Способ по любому из пп. 21-28, используемая для введения стимулируемая композиция имеет концентрацию от $0{,}5 \times 10^6$ клеток/мл до 2×10^6 клеток/мл.

30. Способ по любому из пп. 21-29, где используемая для введения стимулируемая композиция имеет концентрацию равную или приблизительно равную 1×10^6 клеток/мл.

31. Способ по любому из пп. 21-30, включающий регулирование состава стимулированной композиции после инкубирования в условиях стимуляции до введения рекомбинантного рецептора в клетки стимулированной композиции.

32. Способ по любому из пп. 21-32, где клетки стимулированной композиции являются жизнеспособными клетками.

33. Способ получения композиции сконструированных клеток, включающий введение рекомбинантного рецептора в клетки композиции Т-клеток, где указанная композиция Т-клеток имеет концентрацию по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1×10^6 жизнеспособных клеток на мл, где по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток композиции Т-клеток представляют собой CD4+ Т-клетки или CD8+ Т-клетки.

34. Способ по п.33, где концентрация клеток в композиции Т-клеток составляет менее 5×10^6 жизнеспособных клеток на мл.

35. Способ по любому из пп. 33 или 34, где композиция Т-клеток содержит по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 100×10^6 жизнеспособных клеток.

36. Способ по любому из пп. 33-35, где композиция Т-клеток содержит менее 300×10^6 жизнеспособных клеток.

37. Способ по любому из пп. 33-36, где введение включает контактирование Т-клеток путем трансдукции вирусного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

38. Способ по любому из пп. 33-37, где введение осуществляют в бессывороточной среде.

39. Способ по любому из пп. 33-38, где одна или несколько клеток композиции Т-клеток активированы и/или поверхностно экспрессируют рецептор LDL.

40. Способ по любому из пп. 33-39, где по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% или по меньшей мере 60% клеток композиции клеток:

(i) экспрессируют поверхностный маркер, выбранный из группы, состоящей из HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L и 4-1BB;

(ii) внутриклеточно экспрессируют цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамаа, TNF-альфа;

(iii) находятся в фазе G1 или более поздней фазе клеточного цикла; и/или

(iv) способны пролиферировать.

41. Способ по любому из пп. 33-40, где клетки композиции перед введением получают способом, включающим инкубирование входной композиции, содержащей CD4+ и CD8+ Т-клетки, в условиях стимуляции, где указанные условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул

42. Способ по п.41, где инкубирование проводят в бессывороточной среде.

43. Способ получения композиции сконструированных клеток, включающий:

(a) инкубирование входной композиции в условиях стимуляции, получая тем самым стимулированную композицию, где:

входная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, и она содержит по меньшей мере 100×10^6 CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл; и

условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в менее чем 300×10^6 клеток стимулированной композиции, в результате чего образуется сконструированная композиция клеток, где введение включает контактирование клеток стимулированной композиции с вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

44. Способ по п.43, где инкубирование и/или введение осуществляют в бессывороточной среде.

45. Способ по любому из пп. 43 или 44, где CD4+ и CD8+ Т-клетки являются жизнеспособными клетками.

46. Способ по любому из пп. 44, где клетки из стимулированной композиции являются жизнеспособными клетками.

47. Способ по любому из пп. 33-46, где введение инициируют в течение 2 дней после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 2 дней после

объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

48. Способ по любому из пп. 33-47, где введение инициируют в течение 36 часов после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 36 часов после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

49. Способ по любому из пп. 33-48, где введение инициируют в течение 30 часов после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 30 часов после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

50. Способ по любому из пп. 33-49, дополнительно включающий культивирование сконструированной композиции в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение сконструированных клеток, в результате чего получают выходную композицию, содержащую сконструированные Т-клетки.

51. Способ по п.50, где культивирование осуществляют в бессывороточной среде.

52. Способ получения композиции сконструированных клеток, включающий:

(a) инкубирование входной композиции в условиях стимуляции с образованием стимулированной композиции; где входная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, и где входная композиция содержит по меньшей мере 100×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл, и где указанные условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул;

(b) введение рекомбинантного рецептора в менее чем 300×10^6 клеток стимулированной композиции, в результате чего получают сконструированную композицию клеток, где введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор; и

(c) культивирование сконструированной композиции в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение сконструированных клеток, в результате чего получают выходную композицию, содержащую сконструированные Т-клетки.

53. Способ по п.52, где инкубирование, введение и/или культивирование проводят в бессывороточной среде.

54. Способ по п.41-53, где входная композиция имеет соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,2:1 до 0,8:1, необязательно 1:1 или приблизительно 1:1.

55. Способ по любому из пп. 41-54, где входная композиция содержит CD4+ и CD8+, которые являются поверхностно-положительными по CD45RA и CCR7.

56. Способ по п.55, где соотношение CD4+ клеток, поверхностно-положительных по CD45RA и CCR7, и CD8+ клеток, поверхностно-положительных по CD45RA и CCR7, равно или приблизительно равно 1,1:1.

57. Способ по любому из пп. 41-56, где входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CD27 и CCR7.

58. Способ по п.57, где соотношение CD4+ клеток, поверхностно-положительных по CD27 и CCR7, и CD8+ клеток, поверхностно-положительных по CD27 и CCR7, равно или приблизительно равно 1,69:1.

59. Способ по любому из пп. 41-58, где входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CCR7 и поверхностно-негативными по CD62L.

60. Способ по любому из пп. 43-59, где стимулируемая композиция для введения содержит менее 300×10^6 клеток.

61. Способ по любому из пп. 43-60, где стимулируемая композиция для введения содержит от 50×10^6 клеток до 200×10^6 клеток, необязательно 100×10^6 клеток или по меньшей мере 100×10^6 клеток.

62. Способ по любому из пп. 43-61, где стимулируемая композиция для введения имеет концентрацию менее 3×10^6 клеток/мл.

63. Способ по любому из пп. 43-62, стимулируемая композиция для введения имеет концентрацию от $0,5 \times 10^6$ клеток/мл до 2×10^6 клеток/мл, необязательно 1×10^6 клеток/мл или приблизительно 1×10^6 клеток/мл.

64. Способ по любому из пп. 43-63, где состав стимулированной композиции регулируют после инкубирования в условиях стимуляции до введения рекомбинантного рецептора в клетки стимулированной композиции.

65. Способ по любому из пп.1-64, где инкубирование осуществляют в присутствии одного или нескольких цитокинов.

66. Способ по п.65, где один или несколько цитокинов выбирают из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

67. Способ по п.66, где один или несколько цитокинов включают: от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и/или от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

68. Способ по п.66 или 67, где один или несколько цитокинов включают: от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

69. Способ по любому из пп. 1-68, где по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% или по меньшей мере 60% клеток стимулированной композиции:

(i) экспрессируют поверхностный маркер, выбранный из группы, состоящей из HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L и 4-1 BB;

(ii) внутриклеточно экспрессируют цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма, TNF-альфа;

(iii) находятся в фазе G1 или более поздней фазе клеточного цикла; и/или

(iv) способны пролиферировать.

70. Способ по любому из пп. 1-69, где стимулирующий реагент содержит первичный агент, который специфически связывается с компонентом комплекса TCR,

который необязательно специфически связывается с CD3.

71. Способ по п.70, где стимулирующий реагент дополнительно содержит вторичный агент, который специфически связывается с костимуляторной молекулой Т-клеток, где костимуляторная молекула необязательно выбрана из CD28, CD137 (4-L-BB), OX40 или ICOS.

72. Способ по п. 70 или 71, где первичный и/или вторичный агенты содержат антитело, и стимулирующий реагент необязательно включает инкубирование с анти-CD3-антителом и анти-CD28-антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

73. Способ по любому из пп. 71-72, где первичный агент и/или вторичный агент присутствуют на поверхности твердого носителя.

74. Способ по п.73, где твердый носитель представляет собой или содержит шарик.

75. Способ по п.74, где шарик имеет диаметр больше или больше приблизительно 3,5 мкм, но не более чем приблизительно 9 мкм, или не более чем приблизительно 8 мкм, или не более чем приблизительно 7 мкм, или не более чем приблизительно 6 мкм, или не более чем приблизительно 5 мкм.

76. Способ по п.74 или варианту осуществления 75, где шарик имеет диаметр или приблизительно 4,5 мкм.

77. Способ по любому из пп. 74-76, где шарик является инертным.

78. Способ по любому из пп. 74-77, где шарик состоит из полистирола или имеет поверхность из полистирола.

79. Способ по любому из пп. 74-78, где шарик является магнитным или сверхпарамагнитным.

80. Способ по любому из пп. 74-79, где соотношение шариков и клеток составляет менее 3:1.

81. Способ по любому из пп. 74-80, где соотношение шариков и клеток составляет от приблизительно 2:1 до 0,5:1.

82. Способ по любому из пп. 74-81, где соотношение шариков и клеток равно 1:1.

83. Способ по любому из пп. 1-82, где входную композицию инкубируют при стимулирующих условиях в течение менее 48 часов.

84. Способ по любому из пп. 1-83, где входную композицию инкубируют при стимулирующих условиях в течение от 12 часов до 36 часов включительно.

85. Способ по любому из пп. 1-84, где входную композицию инкубируют при стимулирующих условиях в течение от 18 часов до 30 часов включительно.

86. Способ по любому из пп. осуществления 1-85, где входную композицию инкубируют при стимулирующих условиях в течение или приблизительно в течение 24 часов.

87. Способ по любому из пп. 23-86, где контактирование, необязательно трансдукцию, проводят в течение менее чем 48 часов.

88. Способ по любому из пп. 23-87, где контактирование, необязательно трансдукцию, проводят в пределах от 12 часов до 36 часов включительно.

89. Способ по любому из пп. 23-88, где контактирование, необязательно трансдукцию, проводят в течение от 18 часов до 30 часов включительно.

90. Способ по любому из пп. 23-89, где контактирование, необязательно трансдукцию, проводят в течение или приблизительно в течение 24 часов.

91. Способ по любому из пп. 23-90, где вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

92. Способ по любому из пп. 23-91, где вирусным вектором является лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор.

93. Способ по любому из пп. 23-92, где контактирование, необязательно трансдукцию, осуществляют в отсутствие адъюванта трансдукции.

94. Способ по любому из пп. 23-93, где введение осуществляют в присутствии одного или нескольких цитокинов.

95. Способ по п.94, где один или несколько цитокинов выбирают из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

96. Способ по п. 94 или 95, где один или несколько цитокинов содержат: от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и/или от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

97. Способ по любому из пп. 94-96, где один или несколько цитокинов включают: от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

98. Способ по любому из пп. 50-97, где по меньшей мере часть культивирования осуществляют путем смешивания и/или перфузии.

99. Способ по п.98, где по меньшей мере часть культивирования осуществляют со скоростью перфузии равной, приблизительно равной или по меньшей мере равной 500 мл/день, 600 мл/день, 700 мл/день, 750 мл/день, 800 мл/день, 900 мл/день, 1000 мл/день, 1200 мл/день, 1400 мл/день, 1500 мл/день, 1600 мл/день, 1800 мл/день и/или 2000 мл/день.

100. Способ по п. 98 или 99, где по меньшей мере первую часть культивирования выполняют со скоростью перфузии равной, приблизительно равной или по меньшей мере равной 500 мл/день, 750 мл/день или 1000 мл/день, и где по меньшей мере вторая часть культивирования выполняют со скоростью перфузии равной, приблизительно равной или по меньшей мере равной 1200 мл/день, 1400 мл/день или 1500 мл/день.

101. Способ по любому из пп. 98-100, где перфузию инициируют и/или увеличивают, когда клетки достигают определенной плотности.

102. Способ по п.101, где определенная плотность клеток равна, приблизительно равна или составляет по меньшей мере $0,4 \times 10^6$ клеток, $0,5 \times 10^6$ клеток, $0,6 \times 10^6$ клеток, $0,8 \times 10^6$ клеток, $1,0 \times 10^6$ клеток, $1,2 \times 10^6$ клеток, $1,4 \times 10^6$ клеток, $1,6 \times 10^6$ клеток, $1,8 \times 10^6$ клеток, $2,0 \times 10^6$ клеток, $2,2 \times 10^6$ клеток или $2,4 \times 10^6$ клеток.

103. Способ по любому из пп. 98-102, где перфузию инициируют и/или увеличивают до скорости равной или приблизительно равной 750 мл/день, когда клетки достигают плотности равной или приблизительно равной $0,6 \times 10^6$ клеток/мл.

104. Способ по п.98, где перфузию инициируют и/или увеличивают до скорости равной или приблизительно равной 1500 мл/день, когда клетки достигают плотности равной или приблизительно равной $2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

105. Способ по любому из пп. 50-104, где культивирование осуществляют в присутствии одного или нескольких цитокинов.

106. Способ по п.105, где один или несколько цитокинов выбирают из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

107. Способ по п.105 или 10^6, где один или несколько цитокинов включают: от 50 до 400 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и/или от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

108. Способ по любому из пп. 105-107, где один или несколько цитокинов включают: от 50 до 400 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

109. Способ по любому из пп. 50-108, где культивирование инициируют в течение 3 дней после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 3 дней после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

110. Способ по любому из пп. 50-109, где культивирование инициируют в течение 60 часов после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 60 часов после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

111. Способ по любому из пп. 50-110, где культивирование инициируют в течение 48 часов после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 48 часов после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

112. Способ по любому из пп. 50-111, где культивирование осуществляют по меньшей мере до тех пор, пока композиция не достигнет порогового количества Т-клеток.

113. Способ по п.112, где культивирование продолжают в течение по меньшей мере одного дня после достижения порогового количества Т-клеток.

114. Способ по п.113, где пороговое количество Т-клеток равно, приблизительно равно или по меньшей мере равно 1200×10^6 клеток.

115. Способ по любому из пп. 50-114, где пороговое количество Т-клеток равно, приблизительно равно или по меньшей мере равно 3500×10^6 клеток.

116. Способ по любому из пп. 50-115, где пороговое количество Т-клеток равно, приблизительно равно или по меньшей мере равно 5500×10^6 клеток.

117. Способ по любому из пп. 50-116, включающий сбор клеток выходной композиции после культивирования.

118. Способ по любому из пп. 50-117, включающий сбор клеток выходной композиции после культивирования, где клетки выходной композиции собирают по меньшей мере через 9 дней после начала инкубирования в условиях стимуляции.

119. Способ по любому из пп. 50-118, включающий сбор клеток выходной композиции после культивирования, где клетки выходной композиции собирают по меньшей мере через 10 дней после начала инкубирования в условиях стимуляции.

120. Способ по п. 118 или 119, включающий 95% доверительный интервал времени между началом инкубирования и сбора клеток выходной композиции, где интервал времени между началом инкубирования и сбора клеток выходной композиции находится в пределах от 8 до 25 дней.

121. Способ по п.118 или 119, включающий 95% доверительный интервал времени между началом инкубирования и сбора клеток выходной композиции, где интервал времени между началом инкубирования и сбора клеток выходной композиции находится в пределах от 9 до 21 дня.

122. Способ по п.118 или 119, включающий 95% доверительный интервал времени между началом инкубирования и собирающими клетками выходной композиции, где интервал времени между началом инкубирования и сбора клеток выходной композиции находится в пределах от 9 до 16 дней.

123. Способ по любому из пп. 52-122, дополнительно включающий подготовку клеток выходной композиции для криоконсервирования и/или для введения субъекту, необязательно в присутствии фармацевтически приемлемого эксципиента.

124. Способ по п.123 осуществления, где подготовку клеток выходной композиции осуществляют в присутствии криопротектора.

125. Способ по п.124, где криопротектор включает DMSO.

126. Способ по любому из пп. 122-124, где клетки выходной композиции помещают в контейнер, необязательно во флакон или мешок.

127. Способ по любому из пп. 1-126, дополнительно включающий выделение CD4+ и/или CD8+ Т-клеток из биологического образца перед инкубированием.

128. Способ по п.127, где выделение включает отбор клеток на основе поверхностной экспрессии CD4 и/или CD8, необязательно путем положительного или негативного отбора.

129. Способ по п. 127 или 128, где выделение включает проведение отбора методом иммуноаффинной хроматографии.

130. Способ по любому из пп. 127-129, где биологический образец содержит первичные Т-клетки, полученные от субъекта.

131. Способ по п.130, где субъектом является человек.

132. Способ по любому из пп. 127-131, где биологический образец представляет собой или содержит образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), образец нефракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкаферза.

133. Способ по любому из пп. 1-132, где рекомбинантный рецептор способен связываться с антигеном-мишенью, который связан, специфичен и/или экспрессируется на клетке или в ткани при заболевании, расстройстве или состоянии.

134. Способ по п.133, где заболевание, расстройство или состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание,

воспалительное заболевание или опухоль или рак.

135. Способ по п. 133 или 134, где антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

136. Способ по любому из пп. 133-135, где антиген-мишень выбирают из 5T4, 8H9, avb6 интегрина, B7-H6, антигена созревания B-клеток (BCMA), CA9, антигена рака яичек, карбоангидразы 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, поверхностного антигена гепатита B, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, карциноэмбрионального антигена (CEA), CE7, циклина, циклина a2, c-Met, двойного антигена, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), EPHa2, ephrin2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, рецептора эстрогена, фетального AchR, фолат-рецептора альфа, фолат-связывающего белка (FBP), FCR5, FCR5, фетального ацетилхолинового рецептора, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), HMW-MAA, IL-22R-альфа, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Rα2), рецептора домена вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, молекулы адгезии L1-клетки (L1-CAM), ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, лигандов NKG2D, NY-ESO-l, O-ацетилированного GD2 (OGD2), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), PSCA, рецептора прогестерона, сурвивина, ROR1, TAG72, рецепторов VEGF, VEGF-R2, опухоли Вильмса 1 (WT-1), антиген-специфического антигена и антигена, связанного с универсальной меткой.

137. Способ по любому из пп. 1-136, где рекомбинантный рецептор представляет собой или включает функциональный антигенный рецептор не являющийся TCR или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

138. Способ по любому из пп. 1-137, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

139. Способ по любому из пп. 1-138, где рекомбинантный рецептор представляет собой анти-BCMA CAR.

140. Способ по п. 138 или 139, где химерный рецептор антигена включает внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен.

141. Способ по п.140, где антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или фрагмент антитела, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент.

142. Способ по п.141, где фрагмент содержит вариабельные области антитела, соединенные гибким линкером.

143. Способ по п. 141 или 142, где фрагмент включает scFv.

144. Способ по любому из пп. 138-143, где химерный рецептор антигена дополнительно включает спейсер и/или шарнирную область.

145. Способ по любому из пп. 138-144, где химерный рецептор антигена включает внутриклеточную сигнальную область.

146. Способ по п.145, где внутриклеточная сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен.

147. Способ по п.146, где внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен индуцировать первичный активационный сигнал в Т-клетке, сигнальный домен Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий мотив активации иммунорецепторов на основе тирозина (ITAM)

148. Способ по п. 146 или 147, где внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает внутриклеточный сигнальный домен CD3-цепи, необязательно цепи CD3-zeta (CD3ζ), или его сигнальную часть.

149. Способ по любому из пп. 145-148, где химерный рецептор антигена дополнительно включает трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

150. Способ по любому из пп. 145-149, где внутриклеточная сигнальная область дополнительно включает костимуляторную сигнальную область.

151. Способ по п.150, где костимуляторная сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен костимуляторной молекулы Т-клеток или его сигнальную часть.

152. Способ по п.150 или 152, где костимуляторная сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или его сигнальную часть.

153. Способ по любому из пп. 150-152, где костимуляторная сигнальная область находится между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

154. Способ по любому из пп. 113-153, где выходную композицию, содержащую пороговое количество или большее количество клеток, получают в пределах более чем или более чем приблизительно 85%, более или более чем приблизительно 90% или более или более чем приблизительно 95% итераций способа.

155. Способ по любому из пп. 1-154, где бессывороточная среда содержит:

от 0,5 мМ до 5 мМ дипептидной формы L-глутамина в основной среде;

от 0,5 мМ до 5 мМ L-глутамина; и

по меньшей мере один белок, где среда не содержит сыворотки.

156. Бессывороточная среда по п.155, где дипептидная форма L-глутамина представляет собой L-аланил-L-глутамин.

157. Бессывороточная среда по п. 155 или 156, где концентрация дипептидной формы L-глутамина в бессывороточной среде равна или приблизительно равна 2 мМ.

158. Бессывороточная среда по любому из пп. 155-157, где концентрация L-глутамина в бессывороточной среде равна или приблизительно равна 2 мМ.

159. Бессывороточная среда по любому из пп. 155-158, где по меньшей мере один белок содержит одно или несколько из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно одно или несколько из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

160. Композиция, содержащая сконструированные клетки, полученные способом по любому из пп. 1-159.

161. Композиция по п.160, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

162. Композиция по п. 160 или 161, содержащая криопротектор, необязательно DMSO.

163. Изделие, содержащее композицию по любому из пп. 160-162 и инструкции для введения выходной композиции субъекту.

164. Изделие по п.163, где субъект имеет заболевание или состояние, при котором необязательно рекомбинантный рецептор специфически распознает или специфически связывается с антигеном, ассоциированным с или экспрессируемым или присутствующим на клетках при заболевании или состоянии.

165. Способ по любому из пп. 55-159, где во время по меньшей мере части культивирования клетки контролируют в отношении жизнеспособности, концентрации, плотности, количества клеток или в отношении комбинации этих показателей.

166. Способ по п.165, где контроль осуществляют оптическим методом, необязательно микроскопией.

167. Способ по п.165 или 166, где контроль выполняют с помощью микроскопии в светлом поле, флуоресцентной микроскопии, дифференциальной интерференционной контрастной микроскопии, фазоконтрастной микроскопии, цифровой голографии (DHM), дифференциальной цифровой голографии (DDHM) или их комбинации.

168. Способ по любому из пп. 165-167, где контроль осуществляют посредством дифференциальной цифровой голографии (DDHM).

169. Способ по любому из пп. 165-168, где контроль проводят периодически или непрерывно в течение по меньшей мере части времени культивирования, и, необязательно, его проводят по меньшей мере каждые 1 час, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа или 26 часов во время культивирования.

170. Способ по любому из пп. 165-169, где контроль проводят до тех пор, пока клетки не достигнут порогового количества Т-клеток, порогового количества жизнеспособных Т-клеток, пороговой концентрации Т-клеток или пороговой концентрации жизнеспособных Т-клеток.

171. Способ по любому из пп. 165-170, где контроль и культивирование проводят в закрытой системе.

172. Способ по любому из пп. 50-159 и 165-171, где по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в выходной композиции представляют собой клетки с фенотипом памяти; по меньшей мере, 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по

меньшей мере 95% или более 95% клеток в выходной композиции представляют собой клетки с фенотипом центральной памяти; по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в выходной композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B- и/или CD127+ клетки.

173. Способ по любому из пп. 50-159 и 165-172, где итерации способа дают несколько выходных композиций, необязательно из биологических образцов человека, где способ осуществляют среди множества различных отдельных субъектов, где:

средний процент клеток с фенотипом памяти в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%;

средний процент клеток с фенотипом центральной памяти в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%;

средний процент клеток, которые представляют собой CD27+, CD45RO+, CD62L+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B- и/или CD127+ клетки в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%;

средний процент клеток, которые представляют собой CCR7+/CD45RA- или CCR7+/CD45RO+ в нескольких выходных композициях, составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60% или от приблизительно 60% до приблизительно 65%;

средний процент CD4+ Т-клеток с центральной памятью в созданных CD4+ Т-клетках, необязательно CAR+ CD4+ Т-клетках, в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%;

средний процент CD8+ Т-клеток с центральной памятью в созданных CD8+ Т-

клетках, необязательно CAR+ CD8+ Т-клетках, в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%; и/или

средний процент Т-клеток с центральной памятью, необязательно CD4+ Т-клеток с центральной памятью и CD8+ Т-клеток с центральной памятью, в сконструированных Т-клетках, необязательно CAR+ Т-клетках, в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60% или от приблизительно 60% до приблизительно 65%.

174. Способ по любому из пп. 1-159 и 165-173, где способы обеспечивают получение выходных композиций, имеющих предварительно заданный признак, необязательно такой как пороговое количество клеток, экспрессирующих CAR, в выходной композиции, в по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 99%, приблизительно 100% или 100% биологических образцах, полученных от человека, где образцы получены от множества различных отдельных субъектов.

175. Способ по п.174, где множество различных субъектов включают субъекты, имеющие заболевание или состояние.

176. Способ по п.175, где заболевание или состояние представляет собой рак.

177. Способ по п.176, где рак представляет собой гематологический рак, необязательно множественную миелому.

178. Композиция по п.160, в которой:

по меньшей мере, 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более 95% клеток в композиции представляют собой клетки с фенотипом памяти;

по меньшей мере, 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в композиции представляют собой клетки с фенотипом центральной памяти;

по меньшей мере, 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, гранзим B- и/или CD127+ клетки; и/или

по меньшей мере, 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей

мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в выходной композиции представляют собой CCR7+/CD45RA- или CCR7+/CD45RO+ клетки.

IX. ПРИМЕРЫ

[0905] Следующие примеры представлены здесь только для иллюстративных целей, и они не предназначены для ограничения объема притязаний настоящего изобретения.

Пример 1: Способ получения терапевтических композиций сконструированных Т-клеток, экспрессирующих анти-BCMA CAR

[0906] Сконструированную композицию первичных Т-клеток, содержащую CD4+ и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие химерный антиген (CAR) анти-BCMA, получали с помощью иллюстративного процесса, который включал раздельное выделение CD4+ и CD8+ Т-клеток из образца перед объединением выбранных клеток с определенным соотношением для последующих стадий обработки. Отдельные композиции CD4+-и CD8+ клеток были выделены из выделенных PBMC из образца лейкафереза человека, включая человека, имеющего множественную миелому (MM), и отобранные композиции клеток криогенно замораживали. Отобранные CD4+ и CD8+ Т-клеточные композиции затем оттаивали и смешивали в соотношении 1:1 по количеству жизнеспособных CD4+ Т-клеток к жизнеспособных CD8+ Т-клеток до проведения стадий стимуляции, трансдукции и размножения.

[0907] 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 покрытых полистиролом парамагнитных шариков с присоединенными анти-CD3 и анти-CD28-антителами, при соотношении шарики и клеток 1:1 в типовой бессывороточной среде (см. в частности, Пример 3). Среды также содержали рекомбинантные IL-2, IL-7 и IL-15. Стимуляцию проводили при инкубировании в течение от 18 до 30 часов.

[0908] После инкубирования приблизительно 100×10^6 жизнеспособных клеток из стимулированной композиции клеток промывали и ресуспендировали в иллюстративной бессывороточной среде, содержащей рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15. клетки трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим анти-BCMA CAR, Путем спинонокуляции в течение 60 минут с последующим инкубированием приблизительно в течение 18-30 часов при температуре приблизительно 37°C. Плотность клеток после инокуляции составляла приблизительно 1×10^6 клеток/мл. CAR включал антигенсвязывающий домен scFv, специфичный для BCMA, трансмембранную область CD28, 4-1BB костимуляторную сигнальную область и внеклеточную сигнальную область из CD3-zeta.

[0909] Трансдуцированные клетки затем культивировали для размножения путем переноса в биореактор (например, в качающийся биореактор) в приблизительно 500 мл

бессывороточной среды, содержащей двойную концентрацию IL-2, IL-7 и IL-15, которая используется во время стадий инкубирования и трансдукции. В этом иллюстративном способе среда не содержала полоксамера. После достижения пороговой плотности клеток более или приблизительно 0,6 × 10^6 клеток/мл, периодически добавляли по каплям свежую среду в течение, например, от приблизительно 2 до приблизительно 15 минут, с доведением объема среды до 1000 мл, и клетки культивировали в стационарных условиях с качанияем (без перфузии) до достижения пороговой плотности жизнеспособных клеток более или приблизительно равной 0,6 × 10^6 клеток/мл. Если плотность жизнеспособных клеток была более 0,8 × 10^6 клеток/мл, то начинали комбинированная стадия заполнения/перфузии, где первую среду добавляли поэтапно, как указано выше, до тех пор, пока не достигали целевого объема 1000 мл, затем начинали перфузию, как поясняется ниже. Затем среду заменяли полунепрерывной перфузией с непрерывным перемешиванием. Скорость перфузии и/или скорость качания увеличивали по меньшей мере один раз во время фазы размножения клеток, когда плотность клеток увеличивалась. Скорость перфузии увеличивали по меньшей мере один раз во время фазы размножения, когда плотность клеток увеличивалась. Среду добавляли в культуру поэтапно, с общим объемом добавления за один день, определяемым плотностью жизнеспособных клеток (более высокие скорости использовали после достижения определенных плотностей), вплоть до скорости, например, приблизительно 750 мл или 1500 мл всей свежей среды, добавляемой в культуру за один день (более высокие скорости использовали после достижения более высоких концентраций клеток), по каплям, периодически в течение дня, например, приблизительно каждые 0,5 и приблизительно каждые 1,5 или 2 часа. Клетки собирали через один день после достижения общего количества нуклеированных клеток (TNC) по меньшей мере равного или по меньшей мере приблизительно равного 3500 × 10^6 клеток, и в момент времени, когда количество TNC достигало по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 5500 × 10^6 всех нуклеированных клеток. После сбора клеток из композиции клеток удаляли конъюгаты анти-CD3-антител и анти-CD28-антителла с шариками под воздействием магнитного поля.

[0910] Затем из клеток готовили композицию и аликвоты композиций переносили в контейнеры, например, для последующего хранения или использования. В некоторых вариантах осуществления приготовленные композиции или их части переносили в мешки/пакеты для замораживания, подходящие для криоконсервирования и хранения клеточных композиций (например мешки типа CryoStore Freezing Bag), для последующего введения субъектам, и/или композиции или их части переносили во флаконы или другие контейнеры для последующего дополнительного анализа клеток. Клетки криогенно замораживали в условиях, подходящих для последующего оттаивания и применения для введения субъектам. В некоторых случаях в отдельных мешках хранили 30-миллилитровые объемы готовых клеток. В некоторых случаях клетки криоконсервировали при различных концентрациях всех клеток, например, чтобы обеспечить постоянное количество или концентрацию CAR+ Т-клеток в каждой дозе в

контексте использования клеток для введения субъектам. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество клеток-мишеней CAR+ CD3+ равно или приблизительно равно желательному значению (такому как равному или приблизительно равному $37,5 \times 10^6$) CAR+ CD3+ клеток на 30 мл или на пакет, что в некоторых вариантах осуществления включает изменение общих концентраций клеток среди композиций, полученных от различных доноров или пациентов.

[0911] Для отдельных образцов лейкафереза, полученных от нескольких пациентов с множественной миеломой, используя этот пример процесса для получения сконструированных клеточных композиций из таких образцов, было отмечено, что продолжительность части процесса от начала активации до начала сбора составлял от 7 до 10 дней, и средняя продолжительность для этих образцов составляла приблизительно 7,5 дней. Кроме того, определено, что среднее число кумулятивных удвоений популяции по ходу процесса для различных образцов составляло приблизительно 7,5. На Фиг. 6A и Фиг. 6B показаны медианы (горизонтальные линии), межквартильный диапазон (бокс) и 1,5 × интерквартильный диапазон (усы) для процентных содержаний клеток указанных фенотипов (на основе экспрессии CD45RA и CCR7) среди CD4+ CAR+ клеток (Фиг. 6A) и среди CD8+ CAR+ клеток (Фиг. 6B) в сконструированных клеточных композициях. На Фиг. 6C и Фиг. 6D показаны медианы (горизонтальные линии), межквартильный диапазон (бокс) и 0,5 x межквартильный диапазон (усы) для процентных содержаний клеток указанных фенотипов (на основе экспрессии CD27 и CD28), среди CD4+ CAR+ клеток (Фиг. 6C) и среди CD8+ CAR+ Клеток (Фиг. 6D)) в сконструированных клеточных композициях.

Пример 2: Оценка признаков и показателей полученной терапевтической композиции CD4+ и CD8+ CAR-T-клеток

[0912] От здоровых доноров с помощью иллюстративного процесса, описанного в Примере 1, получали множество сконструированных клеточных композиций, содержащих CD4+ и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA CAR. Клетки оценивали на их жизнеспособность, экспрессию CAR анти-BCMA и антигенспецифическую стимуляцию CAR, с использованием рекомбинантного реагента BCMA человека. Сконструированные клеточные композиции, полученные в соответствии с иллюстративным процессом, показали, соответственно, низкое процентное содержание клеток положительных по каспазе и высокую жизнеспособность клеток (измеряли с помощью окрашивания акридином оранжевым (AO) и пропидий иодида). Кроме того, процентная доля клеток CAR+ в CD4+ и CD8+ клетках была схожей. В этом опыте уровень продуцирования цитокинов, включая IFN-гамма, TNF-альфа, IL2, гранзима B и перфорина, после 24-часового инкубирования сконструированных клеточных композиций с антигеном, экспрессирующим клетки-мишени, согласовывался с активностью сконструированных клеток. Эти результаты показали, что активные сконструированные CAR клетки могут быть последовательно получены с использованием способа, описанного в Примере 1.

Пример 3. Бессывороточные среды для применения в процессе

конструирования клеток

[0913] Иллюстративный процесс, описанный в Примере 1, для получения терапевтических Т-клеточных композиций включал стадии, в которых активацию, трансдукцию и культивирование для размножения клеток проводили в бессывороточной среде, которую получали из: (1) жидкой базальной среды, содержащей приблизительно 2 мМ L-аланил-L-глутамина (GlutaMax); (2) первую добавку, содержащую 80 мМ глутамина, и белки, замещающие сыворотку, которые хранили замороженными перед использованием; и (3) вторую добавку, представленную в виде жидкого раствора, например добавку OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement. Базальная среда содержала питательную смесь и буферы, и она не содержала феноловый красный. После оттаивания замороженной добавки компоненты объединяли в следующих количествах: 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, получая тем самым иллюстративную бессывороточную среду для роста клеток (обозначенную как SFM-A). Присутствие L-глутамина в замороженной добавке обеспечивает ее стабильность перед добавлением в базальную среду для минимизации переменной концентрации глутамина и/или увеличения концентрации аммиака в бессывороточной среде, которая может происходить из-за нестабильности L-глутамина. L-глутамин остается растворимым в первой добавке вследствие присутствия L-аланил-L-глутамина. В среду дополнительно добавляли цитокины, такие как IL-2, IL-7 и/или IL-15.

[0914] Получали описанным выше способом семьдесят девять отдельных композиций сконструированных Т-клеток. Наблюдали устойчивое размножение клеток во время культивирования, что подтверждали определением общего количества жизнеспособных клеток для каждого из 79 производственных циклов процесса, включавших исходные клетки, которые были получены как от здоровых доноров, так и от пациентов с множественной миеломой. Все полученные образцы из всех циклов процесса оказались способными образовывать композиции с плотностью клеток выше целевого порогового значения, равного $5,5 \times 10^9$ всех клеток через 6 дней после начала культивирования. Для всех производственных циклов процесса наблюдали более чем 27-кратное увеличение количества жизнеспособных клеток в течение 6 дней после начала культивирования, при этом для более 85% производственных циклов процесса был достигнут указанный уровень клеток через 5 дней их размножения. В целом эти данные подтверждают эффективность бессывороточной среды для роста клеток, полученных от здоровых доноров и от субъектов с заболеванием.

Пример 4: Оценка композиций CAR+ Т-клеток, полученных способом с использованием бессывороточной среды

[0915] Сконструированные генно-инженерные Т-клетки человека, экспрессирующие химерный рецептор антигена (CAR), получали в присутствии иллюстративной среды SFM-A, способом, по существу, как описан в Примере 1. В данном исследовании для получения CAR-экспрессирующих Т-клеток, CD4+ и CD8+ Т-клетки

выделяли отдельно иммуноаффинным обогащением из образцов лейкафереза от доноров, смешивали в соотношении приблизительно 1:1, активировали в присутствии анти-CD3/анти-CD28-магнитных шариков, трансдуцировали вирусным вектором, кодирующим анти-BCMA CAR, и культивировали инкубированием при температуре приблизительно 37°C для размножения клеток. Активацию, трансдукцию и культивирование для размножения клеток проводили в 5% (об./об.) среде, содержащей сыворотку человека, или в среде SFM-A, описанной в Примере 3, в присутствии цитокинов. Характеристики и показатели полученных сконструированных Т-клеточных композиций сравнивали между композициями клеток, полученными от этого же донора либо в присутствии среды, содержащей SFM-A, либо в среде, содержащей сыворотку.

A. Жизнеспособность

[0916] Оценивали жизнеспособность Т-клеток после активации, после активации и трансдукции, и каждый день после инициирования культивирования (день=0) до 6-го дня культивирования. В начале процесса через 2 дня после начала культивирования, в клеточных композициях, культивируемых в присутствии SFM-A по сравнению со средой, содержащей сыворотку, наблюдали более низкие количества клеток и более низкую жизнеспособность клеток. Однако на 3-й день размножения жизнеспособность клеток была сравнима между клетками, культивированными в присутствии SFM-A, и в среде содержащей сыворотку. Этот результат согласуется с задержкой в размножении Т-клеток в присутствии сред, не содержащих сыворотки, поскольку клетки адаптируются к бессывороточным условиям во время начальных стадий процесса. Несмотря на исходное снижение количество клеток, культивирование клеток в присутствии SFM-A приводило к получению немного большего количества жизнеспособных клеток на 5 и 6 день и сравнимых процентных долей жизнеспособных клеток в среде, содержащей сыворотку.

B. Активность CAR-Т-клеток

[0917] Функциональную активность CAR+ Т-клеток в Т-клеточных композициях после размножения клеток оценивали по накоплению цитокинов после стимуляции форболмиристатацетатом (PMA)/иономицином в присутствии ингибитора Гольджи. Полифункциональное накопление цитокинов оценивали по внутриклеточному окрашиванию цитокинов (ICS) для IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа в клетках, которые также были совместно окрашены в отношении поверхностного CD4, CD8 или анти-BCMA CAR. В клетках, культивированных в присутствии SFM-A по сравнению с клетками, культивированными в среде, содержащей сыворотку, наблюдали сравнимое процентное содержание функциональных CAR+ CD4+ Т-клеток или CAR+ CD8+ Т-клеток, по анализу определения полифункционального накопления IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа.

[0918] Также измеряли продуцирование цитокинов IL-2, IFN-гамма, TNF-альфа и GM-CSF в супернатанте с использованием анализа Luminex Multiplex Assay после совместного культивирования полученных композиций анти-BCMA CAR+ Т-клеток с клетками экспрессирующими антиген. Секреция воспалительных цитокинов (IL-2, TNF-альфа, GM-CSF и IFN-гамма) оказалась сравнимой для культур, полученных в

присутствии SFM-A, и в средах, содержащих сыворотку.

C. Маркер апоптоза

[0919] Оценивали поверхностную экспрессию активированной каспазы 3 для анти-BCMA CAR+ Т-клеточных композиций, которые были получены способом с использованием либо среды, содержащей сыворотку, либо бессывороточную среду SFM-A, и композиции также подвергали последующему криоконсервированию, и их оттаивали перед анализом. Менее 5% полученных сконструированных CD3+ CAR+ клеток, культивированных в присутствии SFM-A, были положительными по активированной каспазе-3. Доля CD3+ CAR+ клеток, которые были положительными по активированной каспазе-3, была ниже в композициях Т-клеток, полученных от этого же донора, при культивировании в присутствии SFM-A по сравнению с клетками, культивированными в среде, содержащей сыворотку.

D. Эффективность трансдукции

[0920] Процент трансдукции для полученных композиций Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии. Поверхностную экспрессию анти-BCMA CAR измеряли с использованием специфичного для CAR реагента. В композициях Т-клеток, полученных от одного донора, где композиции получали способом с использованием SFM-A, показали более эффективную трансдукцию, по сравнению с клетками, полученными способом и использованием среды, содержащей сыворотку. В иллюстративном примере эффективность трансдукции увеличилась от приблизительно 53% до приблизительно 68%.

Пример 5: Противоопухолевое действие Т-клеток, экспрессирующих CAR. полученных способом с использованием бессывороточной среды

[0921] Композиции анти-BCMA CAR+ Т-клеток получали способом, с использованием среды SFM-A, по существу, как описано в Примерах 1 и 3. В качестве сравнения получали композицию Т-клеток от этого же донора аналогичным способом, за исключением того, что использовали среду, содержащую сыворотку. Противоопухолевое действие полученных композиций CAR+ Т-клеток оценивали контролем опухолей после адоптивного переноса клеток на модели опухолей, включая модель ксенотрансплантата с клетками множественной миеломы OPM2 человека

[0922] Для получения мышей с опухолями, мышам в возрасте от шести до восьми недель вводили 2×10^6 клеток OPM2 (клетки множественной миеломы), трансфицированных люциферазой светлячков (OPM2-ffluc). Размер опухоли контролировали на 13-й день с использованием биолюминесцентной визуализации, и на 14-й день мышам вводили однократную внутривенную (iv) инъекцию композиции анти-BCMA CAR+ Т-клеток, которую получали способом с использованием SFM-A, или способом с использованием среды, содержащей сыворотку. Оцениваемые композиции анти-BCMA CAR+ Т-клеток получали от одного и того же донора-человека. CAR-экспрессирующие Т-клетки вводили в дозе 1×10^6, 5×10^5 или $2{,}5 \times 10^5$ клеток Клетки, которые не экспрессируют CAR (mock), использовали в качестве негативного контроля. Рост опухоли и выживание мышей контролировали в течение 100-дневного периода

времени после введения клеток.

[0923] Противоопухолевую активность адоптивно переносимых клеток, экспрессирующих CAR, регистрировали с помощью биолюминесцентной визуализации в течение нескольких дней после инъекции клеток и до 100-го дня. Для получения биолюминесцентного изображения мышам внутрибрюшинно (ip) вводили субстрат люциферин (CaliperLife Sciences, Hoppkinton, MA), ресуспендированный в PBS (15 мкг/г веса тела). Мышей анестезировали и визуализировали по существу так, как описано в WO 2015/095895. В каждый момент времени регистрировали общий поток фотонов (фотон/с). Мышей, получавших негативный контроль, умерщвляли через 22 и 26 дней после переноса CAR-T-клеток из-за высокой опухолевой нагрузки. Т-клетки, экспрессирующие CAR, полученные с использованием либо среды SFM-A, либо среды, содержащей сыворотку, замедляют рост опухоли и пролонгировали выживание на сравнимых уровнях для всех использованных доз.

Пример 6: Иллюстративные условия процесса

[0924] Оценивали различные параметры, относящиеся к условиям, используемым в иллюстративных процессах, которые аналогичны описанному в Примере 1 процессу, но с различными аспектами на некоторых стадиях. Эти измененные аспекты включали показатели плотности при активации и время инкубирования, параметры трансдукции, тип и концентрацию используемого цитокина (цитокинов) и скорости перфузии для конечных клеточных композиций, полученных этими различными способами.

[0925] Каждый из процессов в этом Примере 6 включал стадию отбора, на которой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки выделяли из образцов лейкафереза от доноров, получая две отдельные композиции CD4+ и CD8+ Т-клеток, соответственно. После этого смешивали клетки в соотношении приблизительно 1:1 жизнеспособных CD4+ клеток и жизнеспособных CD8+ клеток. Выполняли активацию смешанных клеток в присутствии анти-CD3/анти-CD28-магнитных шариков и одного или нескольких цитокинов в бессывороточных средах, проводили трансдукцию вирусным вектором, кодирующим CAR, и клетки культивировали в присутствии анти-CD3/анти-CD28-магнитных шариков и одного или нескольких цитокинов в бессывороточных средах. После этого готовили конечный препарата клеток и подвергали его криоконсервирования. В ходе этого процесса использовали различные параметры, влияние которых оценивали.

А. Время инкубирования при активации

[0926] В одном исследовании варьировали продолжительность инкубирования после отбора и до трансдукции (в присутствии шариков, покрытых анти-CD3/анти-CD28, цитокина (цитокинов) и в бессывороточной среде). В частности, инкубирование проводили в течение 24 часов (n=5 композиций клеток от 3-х доноров) или течение 48 часов (n=2 композиций клеток от 2-х доноров).

[0927] Эффективность трансдукции Т-клеток в конечной композиции клеток оценивали проточной цитометрией с окрашиванием для поверхностной экспрессии CD3 (с использованием реагента против CD3) и CAR (с использованием рекомбинантного

реагента BCMA-Fc). Установлено, что сконструированные клеточные композиции, полученные способом с 24-часоым инкубированием до начала трансдукции, имеют приблизительно в 2 раза больший процент трансдуцированных (CD3+ CAR+) Т-клеток, по сравнению с композициями клеток, полученные способом с 48-часовым инкубированием перед началом трансдукции.

[0928] Кроме того, сконструированные клетки, полученные способами с различными временами инкубирования, совместно культивировали в течение 4 дней с использованием K562-BCMA. Для контроля пролиферации клетки метили окрашивающим маркерным красителем CELLTRACE VIOLET (CTV; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). После совместного культивирования клетки окрашивали для оценки поверхностной экспрессии анти-BCMA CAR, CD4 и CD8 и измеряли методом проточной цитометрии.

[0929] Полученные результаты обобщены в Таблице E1. Более высокий уровень поверхностной экспрессии CAR в CAR+ клетках, как определено по величине средней интенсивности флуоресценции (MFI), и более высокая степень индуцированной антигеном пролиферации клеток в этом анализе (измеренная путем разведения в красителе CTV, где зарегистрировано снижение MFI CTV), в CD4+ и CD8+ Т-клетках, наблюдали в композициях сконструированных клеток, которые были получены с помощью процесса, в котором проводили 24-часовое инкубирование перед трансдукцией с анти-CD3/анти-CD28 магнитными шариками, по сравнению с процессом, в котором проводили 48-часовое инкубирование. Полученные результаты согласуются с повышенной эффективностью трансдукции CAR и специфической в отношении антигена CAR функциональностью, в соответствии с иллюстративным процессом, в котором после отбора и перед трансдукцией выполняли инкубирования в течение менее 48 часов, например, приблизительно 24 часа.

Таблица E1: Окрашивание CAR и CTV после инкубирования с клетками-мишенями K562-BCMA

	Тип клеток	**Медиана MFI CAR**	**Медиана MFI CTV**
24-часовое стимулирование	CD4+ Т-клетки	14463	4057
	CD8+ Т-клетки	16187	4116
48-часовое стимулирование	CD4+ Т-клетки	5659	22932
	CD8+ Т-клетки	12862	8099

B. Плотность клеток при активации

[0930] Оценивали влияние плотности клеток во время инкубирования с анти-CD3/Анти-CD28 магнитными шариками, цитокинами и средами перед трансдукцией сконструированных клеточных композиций, которые были получены способом, в котором инкубирование инициировали при исходной плотности клеток 1,5 × 10^6 клеток/мл, в сравнении с композициями клеток, которые были получены способом, где инкубирование

инициировали при плотности клеток 3 × 10^6 клеток/мл, и в сравнении с композициями клеток, которые были получены способом, где инкубирование инициировали при плотности клеток 5 × 10^6 клеток/мл. В каждом случае продолжительность инкубирования составляла приблизительно 24 часа.

[0931] Для оценки влияния плотности клеток на функциональную активность клеток, полученных такими способами, клетки подвергали серийному стимулирующему анализу, в котором получаемые анти-BCMA CAR Т-клетки инкубировали в совместных культурах с облученными клетками-мишенями K562-BCMA в течение нескольких циклов воздействия антигена в течение 7 или более дней. На 4-й день совместного культивирования клетки собирали, подсчитывали и повторно инкубировали с новыми клетками-мишенями в тех же условиях культивирования доведения количества клеток до исходной плотности при высевании. Т-клетки собирали в дни 4 и 7 и оценивали в отношении пролиферации, как описано выше.

[0932] В целом, способы, в которых инкубирование перед трансдукцией инициировали при плотности клеток 1,5 × 10^6 клеток/мл или 3 × 10^6 клеток/мл, привели к получению композиций клеток, полученных от нескольких доноров-людей, со сравнимой антигенспецифичной функциональностью и пролиферативной способностью, при сравнении их с примерами сконструированных композиций клеток, полученных способом, в котором стадия инкубирования инициировали при плотности клеток 5 × 10^6 клеток/мл. Эти результаты согласуются с заключением, что улучшенные показатели пролиферации и антигенспецифичные функции сконструированных клеточных композиций, полученных способом с несколькими циклами стимуляции, где инкубирование перед трансдукцией инициировали при плотности клеток менее 5 × 10^6 клеток/мл.

С. Условия трансдукции

[0933] Оценивали влияние условий трансдукции. Композиции клеток получали способами, описанными выше, с вариациями условий трансдукции. В частности, в различных способах трансдукцию проводили с или без инокуляции (например, при 1600 g в течение 60 минут с использованием вертикальной центрифуги) и с адъювантом трансдукции или без него. Установлено, что трансдукция со спинокуляцией приводит к более высокому содержанию CD3+ CAR+ клеток, по сравнению с содержанием клеток, когда трансдукцию проводили без спинокуляци В этих способах наблюдали сходные эффективности трансдукции, даже когда на стадии трансдукции не использовали адъювант трансдукции.

Пример 7: Соотношение анти-CD3/анти-CD28-шариков и клеток во время размножения

[0934] Оценивали влияние соотношения анти-CD3/анти-CD28-шариков и клеток во время инкубирования (размножения) после трансдукции на свойства сконструированных клеток, полученных способом, аналогичным способу, описанному в Примере 1 и Примере 6, варьируя соотношение анти-CD3/анти-CD28 магнитных шариков и клеток, во время

инкубирования после трансдукции как описано в Примере 1, за исключением того, что на стадии размножения использовали среду, содержащую сыворотку, при соотношении шариков и клеток равном 1:1 или 3:1. Композиции клеток на стадии размножения после трансдукции оценивали ежедневно в отношении увеличения количества клеток, жизнеспособности клеток, внеклеточного pH и уровней лактата. В этом анализе клетки, для которых эта стадия инкубирования осуществлялась с использованием шариков и клеток в соотношении 3:1, показали более высокую степень размножения в течение 5 дней после инокуляции в биореакторе с качанием, но они показали пониженную тенденцию в отношении жизнеспособности клеток через 3 дня после инокуляции. Было обнаружено, что внеклеточные уровни pH и уровни лактата обратно коррелируют. Для клеток, инкубированных при соотношении 1:1, накопление внеклеточного лактата и снижение pH замедляются через 3 дня, даже если клетки продолжают размножаться. Для клеток, инкубированных при соотношении 3:1, уровни внеклеточного лактата продолжают накапливаться, и pH продолжает снижаться после 3 дня инкубирования, что согласуется с уменьшением жизнеспособности клеток.

[0935] Оценивали способы получения сконструированных клеток с различными соотношениями анти-CD3/анти-CD28 магнитных шариков и клеток. Сконструированные клеточные композиции получали способом, который включал отбор CD4+ и CD8+ Т-клеток из образцов лейкафереза от доноров с последующим смешиванием клеток в соотношении 1:1 до активации, и смешиванием полученной смеси клеток и анти-CD3/анти-CD28 магнитных шариков в соотношении 1:1 или 3:1 в среде, содержащей сыворотку, с последующей трансдукцией анти-BCMA CAR и культивированием для размножения клеток.

[0936] Клетки из полученных сконструированных композиций исследовали с помощью метода проточной цитометрии. Клетки окрашивали с использованием рекомбинантного реагента BCMA-Fc для оценки экспрессии CAR и для оценки поверхностной экспрессии CD3, CD4, CD8 и активированной каспазы-3, маркера апоптоза. Приблизительно 50% CD3+ клеток, которые стимулировали при соотношении шариков и клеток 3:1, были положительными по активированной каспазе-3, и приблизительно половина их были положительными по экспрессии анти-BCMA CAR. Напротив, приблизительно 10% CD3+ клеток, которые стимулировались в соотношении 1:1, были положительными по активированной каспазе-3, и 31% этих клеток экспрессировали CAR. Наблюдали схожие соотношения CD4+ и CD8+ клеток, которые были положительными по активированной каспазе-3.

[0937] Эти результаты согласуются с улучшенной жизнеспособностью сконструированных клеток в композициях, стимулированных при соотношении 1:1 анти-CD3 и анти-CD28 шариков и клеток.

Пример 8: Включение цитокинов в процесс получения композиций, содержащих клетки CAR Т-клетки

[0938] Оценивали влияние цитокинов на свойства сконструированных клеток,

полученных способом, аналогичным способу, описанному в Примере 1 и Примере 6, за исключением типов цитокинов, присутствующих в среде. Сконструированные композиции, содержащие CD4+ и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA CAR, получали из выделенных Т-клеток в присутствии различных комбинаций IL-2, IL-7 и IL-15. Оценивали Т-клетки от шести различных доноров с множественной миеломой.

[0939] CD4+ и CD8+ Т-клетки выделяли из образцов, полученных от пациентов с множественной миеломой. Клетки стимулировали в присутствии магнитных анти-CD3/анти-CD28 шариков, трансдуцировали вирусным вектором, кодирующим анти-BCMA CAR, и культивировали для размножения клеток. Каждую из стадий стимуляции, трансдукции и размножения выполняли в бессывороточной среде, в присутствии цитокинов, либо только IL-2; IL-2, IL-7 и IL-15; IL-2 и IL-15; или IL-2 и IL-7.

[0940] Клетки сконструированных композиций анализировали методом проточной цитометрии с использованием рекомбинантного реагента BCMA-Fc для оценки экспрессии анти-BCMA CAR и для оценки поверхностной экспрессии CD3, CD4, CD8 и активированной каспазы-3.

[0941] Высокие уровни CD3+ CAR+ клеток наблюдали во всех сконструированных клеточных композициях, полученных в присутствии различных комбинаций цитокинов. Комбинация всех трех цитокинов привела к самому низкому процентному содержанию CD3+ Т-клеток, положительных по активированной каспазе-3.

[0942] Антиген-стимулированную активность оценивали с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS). Клетки из сконструированных композиций совместно культивировали с облученными клетками MM.1S, линией клеток множественной миеломы человека, которая экспрессирует BCMA, в присутствии ингибитора Гольджи. Клетки оценивали в отношении накопления внутриклеточного цитокина IL-2, ILN-гамма или TNL-альфа, или в отношении полифункционального окрашивания всех трех цитокинов. Результаты показали, что сконструированные клеточные композиции, полученные от каждого донора, содержали функциональные CD4+ CAR+ и CD8+ CAR+ Т-клетки. В сконструированных клеточных композициях, полученных с каждой комбинацией цитокинов, наблюдали стимулированные антигеном CD4+ и CD8+ клетки, которые были положительными по внутриклеточному IL-2, ILN-гамма, TNL-альфа и полифункциональные клетки, положительные по всем трем цитокинам.

[0943] Клетки сконструированных композиций оценивали на суб-фенотипы с помощью проточной цитометрии путем окрашивания в отношении CD45RA, CCR7, CD27 и CD28. Результаты окрашивания по CD45RA и CCR7 показали, что сконструированные клеточные композиции, получаемые при каждых условиях выполнения процесса, преимущественно состоят из CD45RA+CCR7+CD4+ и CD8+ Т-клеток. Низкий уровень CD45RA+CCR7-клеток наблюдали во всех сконструированных клеточных композициях. Результаты окрашивания CD27 и CD28 показали, что сконструированные клеточные композиции, получаемые при каждых условиях выполнения процесса, содержали в

основном CD27+CD28+CD4+ и CD8+ Т-клетки. Низкие уровни CD27-CD28-CD4+ и CD8+ Т-клеток наблюдали во всех сконструированных клеточных композициях.

Пример 9: Корреляция между фенотипом исходной композиции и соотношением CD4+ и CD8+ CAR-экспрессирующих клеток в композициях CAR+ Т-клеток

[0944] Композиции CAR+ Т-клеток, содержащие аутологичные Т-клетки, экспрессирующие химерный рецептор антигена (CAR), были получены из афереза от 11 доноров, и из каждого образца от донора отдельно готовили четыре испытуемых образца. Одним из доноров является пациент с миеломой, а остальные доноры были здоровыми субъектами. После промывки каждого образца афереза каждый испытуемый образец оценивали методом проточной цитометрией в отношении жизнеспособности клеток с использованием маркера апоптоза и на поверхностную экспрессию CD4 и CD8 для определения соотношения жизнеспособных CD4+ и CD8+ Т-клеток (соотношение CD4/CD8) в каждом образце афереза.

[0945] CD4+ и CD8+ Т-клетки отбирали из образцов афереза с помощью иммуноаффинной селекции. CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки объединяли в соотношении 1:1 жизнеспособных CD4+ и CD8+ клеток. Образец объединенных клеток оценивали методом проточной цитометрии в отношении жизнеспособности клеток с использованием специфичного к апоптозу маркера и по поверхностной экспрессии маркеров, которые включали CD4, CD8, CD45RA и CCR7. Определяли соотношение жизнеспособных CD45RA+/CCR7+ CD4+ клеток и жизнеспособных CD45RA+/CCR7+ CD8+ клеток (соотношение CD45RA+/CCR7+CD4/CD8) в смеси отобранных CD4-и CD8-клеток.

[0946] Для получения композиции CAR+ Т-клеток объединенные CD4+ и CD8+ Т-клетки активировали путем инкубирования с покрытыми анти-CD3 и анти-CD28 антителами шариками в присутствии цитокинов и затем трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим анти-BCMA CAR. CAR содержал антигенсвязывающий домен scFv, специфичный для BCMA, спейсер, трансмембранную область CD28, костимуляторную сигнальную область 4-1BB и внеклеточную сигнальную область, полученную из CD3-zeta. После трансдукции клетки размножали и замораживали путем криоконсервирования. Клетки замороженной композиции оттаивали и оценивали методом проточной цитометрии в отношении жизнеспособности, поверхностной экспрессии CD4 и CD8, и кспрессии CAR с использованием реагента BCMA-Fc. Определяли соотношение жизнеспособных CAR+ клеток которые являлись CD4+, и жизнеспособные клетки CAR+, которые являлись CD8+ (соотношение CAR+ CD4/CD8).

[0947] Сравнивали соотношение CD4/CD8 в образцах афереза или соотношение CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 в смеси отобранных CD4-и CD8-клеток, с соотношением CAR+ CD4/CD8 в сконструированной композиции CAR-Т-клеток. Степень корреляции средних соотношений от каждого субъекта оценивали двумерным анализом, и двумерный нормальный эллипс распределения с вероятностью 0,990 для полученных данных, показаны соответственно на Фиг. 1A и на Фиг. 1B. В Таблице E2A и Таблице E2B

представлены результаты корреляционного анализа по Пирсону, выполненного в отношении данных, представленных на Фиг. 1A и Фиг. 1B соответственно.

Таблица E2A: Двумерный нормальный эллипс при P=0,990; соотношение CD4/CD8 в образцах афереза				
Показатель	**Среднее значение**	**Станд. отклонение**	**Корреляция**	**P-значение**
Исходное соотношение CD4/CD8	1,57	0,42	-0,11	0,75
Исходное соотношение CAR+ CD4/CD8	1,35	1,00		

Таблица E2B: Двумерный нормальный эллипс при P=0,990; Двумерный нормальный эллипс при P=0,990; соотношение CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 в смеси отобранных CD4 и CD8 клеток				
Показатель	**Среднее значение**	**Станд. отклонение**	**Корреляция**	**P-значение**
Исходное соотношение CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8	1,52	1,09	0,99	**<0,0001**
Исходное соотношение CAR+ CD4/CD8	1,35	1,00		

[0948] Как показано на Фиг. 1A и в Таблице E2A, в этом эксперименте соотношение жизнеспособных CD4/CD8 CD4+ и CD8+ Т-клеток из образца афереза не коррелирует с соотношением CAR+ CD4/CD8 в конечной композиции. Этот результат согласуется с наблюдениями, что смешивание очищенных CD4 и CD8 Т-клеток в соотношении 1:1 до активации на основе количества всех жизнеспособных клеток, не обязательно коррелирует с соотношением 1:1 CD4+ и CD8+ Т-клеток в выходной композиции Т-клеток.

[0949] Как показано на Фиг. 1B и в Таблице E2B, в этом эксперименте соотношение CAR+ CD4/CD8 в конечной композиции Т-клеток положительно коррелирует с исходным соотношением CD4/CD8 подобных наивным Т-клеток, что следует из определенного значения соотношения CD45RA+/CCR7+CD4/CD8 в смеси CD4 и CD8 клеток. В частности, результаты, представленные на Фиг. 1B, показывают, что корреляция между соотношением CD45RA+/CCR7+/CD4+ клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ клеток в исходной пробе, и соотношением CAR+ CD4/CD8 в композиции Т-клеточной является высокой, что подтверждает значение коэффициента корреляции по Пирсону и значение p <0,0001. Эта корреляция сохранялась, несмотря на различия во входной композиции и между процессами. На основании этой модели, подходящей из этого набора образцов, было определено соотношение CD45RA+/CCR7+/CD4+ и CD45RA+/CCR7+/CD8+ клеток приблизительно равное 1,1:1, что привело к соотношению CAR+ CD4/CD8 приблизительно равному 1:1 для выходной композиции Т-клеток.

[0950] Эти данные подтверждают гипотезу о том, что можно контролировать и/или регулировать соотношение и/или состав CD4+ клеток и CD8+ клеток в выходной композиции Т-клеток путем регулирования соотношения субпопуляции подобных наивным CD4+ Т-клеток и субпопуляции подобных наивным CD8+ Т-клеток, как определено по поверхностной экспрессии CD45RA+ и CCR7+.

Пример 10:Корреляция между фенотипами исходной популяции Т-клеток и соотношением CAR+ CD4+ и CAR+ CD8+ Т-клеток в сконструированных композициях CAR+ Т-клеток

[0951] В общей сложности 50 композиций сконструированных CAR+ Т-клеток было получено из образцов для афереза, собранных от 15 здоровых доноров и одного пациента с множественной миеломой. Для получения композиций CAR+ Т-клеток, жизнеспособные отобранные CD4+ и CD8+ Т-клетки объединяли в исходную композицию клеток в соотношении 1:1, а затем активировали, трансдуцировали и размножали, как описано в Примере 9. Образцы из исходных композиций объединенных жизнеспособных CD4+ и CD8+ Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии на жизнеспособность и оценивали поверхностную экспрессию маркеров, которые включали CD4, CD8, CD27, CD45RA, CCR7 и CD62L.

[0952] Образцы из композиций сконструированных CAR+ Т-клеток оценивали на экспрессию CAR и на поверхностную экспрессию маркеров, которые включали CD4 и CD8. Средние значения рассчитывали для соотношений CD4+ CAR+ Т-клеток и CD8+ CAR+ Т-клеткам (соотношения CAR+ CD4/CD8) в отдельных композициях CAR+ Т-клеток от одного и того же донора, которые были получены с использованием того же приводимого в качестве примера процесса, который описан в Примере 9, за исключением того, что некоторые параметры процесса были изменены. Средние значения соотношений CAR+ CD4/CD8 анализировали на корреляции с различными фенотипами исходных композиций объединенных жизнеспособных CD4+ и CD8+ клеток. Объединение отобранных CD4+ и CD8+ Т-клеток в соотношении 1:1 до активации необязательно коррелировало с составляющим 1:1 соотношением CAR+ CD4 и CAR+ CD8 в полученных выходных композициях клеток.

[0953] Степень корреляции между средними отношениями CAR+ CD4/CD8 и фенотипами от каждого донора оценивали с помощью двумерного анализа. Двумерные нормальные эллипсы распределения при вероятности=0,950, показаны для отношений CD45RA+/CCR7+/CD4+ Т-клеток и CD45RA+/CCR7+/CD8+ Т-клеток (моотношения CD45RA+ CCR7+ CD4/CD8; Фиг. 2A); CD62L-/CCR7+/CD4+ и CD62L-/CCR7+/CD8+ (соотношение CD62L-CCR7+ и CD4/CD8; Фиг. 2B); и соотношения CD27+/CCR7+/CD4+ и CD27+/CCR7+/CD8+ (соотношение CD27+CCR7+ CD4/CD8; Фиг. 2C). В Таблице E3 показаны результаты корреляционного анализа по Пирсону, выполненного в отношении данных, представленных на Фиг. 2A-2C.

Таблица 2: Двумерный нормальный эллипс распределения при P=0,950 для иллюстративных фенотипов					
Фенотип	**Среднее**	**Станд.**	**Корреляция**	**P-значение**	**Кол-во**

	значение	**отклонение**			
Соотношение CD45RA+ CCR7+ CD4/CD8	1,14	0,56	0,88	<0,0001	16
Соотношение (%) CD62L- CCR7+ CD4/CD8	1,66	0,83	0,88	<0,0001	16
Соотношение (%) CD27+ CCR7+ CD4/CD8	2,01	0,91	0,93	<0,0001	16
Соотношение CAR+ CD4/CD8 на выходе	1,22	0,80			

[0954] Анализ показал, что при использовании приводимого в качестве примера протокола, описанного в Примере 9, наблюдалась положительная корреляция между соотношением CAR+ CD4/CD8 и соотношением CD45RA+ CCR7+ CD4/CD8 Т-клеток здоровых доноров, но в этом эксперименте, не для одного образца от пациента. Было показано, что наблюдается положительная корреляция между соотношением CAR+ CD4/CD8 и соотношениями CD62L- CCR7+ CD4/CD8 и CD27+ CCR7+ CD4 CD8 в исходных композициях клеток, как от здоровых доноров, так и в образце от пациента. Основываясь на установленной модели, рассчитано, что соотношение CD27+ CCR7+ CD4/CD8, составляющее 1,69:1 в исходной композиции, в соответствии с прогнозами создаст выходную композицию клеток с соотношением CAR+ CD4/CD8, приблизительно равным 1:1. Эти результаты согласуются с обнаружением, что соотношение CD27+ CCR7+ CD4/CD8 можно регулировать в исходной композиции клеток для контроля и/или прогнозирования результирующего соотношения CAR+ CD4/CD8 в композиции сконструированных клеток.

Пример 11: Процесс получения композиции CAR+ Т-клеток на основе фенотипа исходной композиции.

[0955] Десять композиций CAR+ Т-клеток, содержащих аутологичные Т-клетки, экспрессирующие CAR, были получены в результате афереза материала, собранного от 3 отдельных доноров, включая двух здоровых доноров и одного пациента с множественной миеломой. CD4+ и CD8+ Т-клетки отбирали из образцов афереза, как описано в Примере 9. Образцы афереза и отобранные CD4+ и CD8+ Т-клетки оценивали с помощью метода проточной цитометрии на жизнеспособность и поверхностные маркеры, включающие CD27, CCR7, CD4 и CD8. Определяли долю CD27+ CCR7+ клеток среди отобранных CD4+ и CD8+ Т-клеток, причем каждый донор демонстрировал различное соотношение

CD27+ CCR7+ CD4+ клеток и CD27+ CCR7+ CD8+ клеток в образцах афереза. Например, в образце от пациента соотношение CD27+ CCR7+ CD4+ клеток и CD27+ CCR7+ CD8+ клеток составляло приблизительно 12,2:1, тогда как в двух образцах от здоровых доноров соотношения CD27+ CCR7+ CD4+ клеток и CD27+ CCR7+ CD8+ клеток составляли 3,56:1 и 2,15:1. Входные композиции клеток были получены либо путем (1) объединения отобранных CD4+ и CD8+ клеток в соотношении 1:1 для жизнеспособных CD4+ и CD8+ клеток (жизнеспособных CD4/CD8), либо путем (2) объединения CD4+ и CD8+ клеток в соотношении 1,69:1 для CD27+ CCR7+ CD4+ клеток и CD27+ CCR7+ CD8+ клеток (CD27+ CCR7+ CD4/CD8) до активации. В общей сложности либо $300x10^6$ клеток, либо $100x10^6$ клеток входных композиций были активированы, трансдуцированы и размножены для получения выходных композиций клеток, по существу, как описано в примере 9

[0956] Установлено, что общее количество клеток на стадии активации не оказывает влияния на соотношение CAR+ CD4/CD8. Выходные композиции клеток, полученные из исходных композиций, содержащих CD27+ CCR7+ CD4/CD8 клетки, смешанные в соотношении приблизительно 1,69:1, в том числе из образца от пациента, показали соотношения CAR+ CD4/CD8, которые были близки к желательному целевому соотношению 1:1 (например, приблизительно от 1,86:1 до 1:1,86). Выходные композиции клеток, полученные из исходных композиций, содержащих жизнеспособные CD4/CD8 клетки, смешанные в соотношении 1:1, показали более значительную вариацию соотношений CAR+ CD4/CAR+ CD8, по сравнению с композициями, полученными из входных композиций, содержащих CD4+ и CD8+ клетки в соотношении 1,69:1 CD27+ CCR7+ CD4+ клеток и CD27+ CCR7+ CD8+ клеток. В этом эксперименте выходные композиции, полученные с использованием материала от пациента, в приводимом в иллюстративном процессе, показали сотношения CAR+ CD4/CAR+ CD8, приблизительно равные 7,6 и 8,6, в случае активации $100x10^6$ клеток или $300x10^6$ клеток, соответственно. При смешивании на основе фенотипа в аналогичном процессе, например, при соотношении 1,627:1 CD27+ CCR7+ CD4+ Т-клеток и CD27+ CCR7+ CD8+ Т-клеток, конечное соотношение CAR+ CD4/CAR+ CD8 составляло 1,6 и 1,3 в случае активации $100x10^6$ клеток или $300x10^6$ клеток, соответственно. Эти результаты согласуются с тем, что определенные фенотипы, например CD27+/CCR7+ клетки, могут коррелировать с результирующими соотношениями CAR+ CD4/CAR+ CD8 в выходных композициях, полученных из образцов от здоровых доноров, так и от пациента.

Пример 12: Оценка образцов от больных субъектов с корреляцией между фенотипом исходной композиции и соотношением CD4+ к CD8+ CAR-экспрессирующим клеткам в композиции CAR+ Т-клеток

[0957] Композиции CAR+ Т-клеток, содержащие аутологичные Т-клетки, экспрессирующие химерный рецептор антигена (CAR), были получены в результате афереза материала, собранного от 7 отдельных доноров с множественной миеломой.

[0958] CD4+ и CD8+ Т-клетки отбирали из образцов афереза иммуноаффинным

методом. CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки объединяли в соотношении 1:1 жизнеспособных CD4+ и CD8+ клеток. Образец объединенных клеток оценивали на экспрессию поверхностных маркеров, которые включали CD4, CD8, CD27, CD45RA, CCR7 и CD62L. В смеси отобранных CD4 и CD8 клеток определяли соотношение следующих клеточных фенотипов: (1) CD27+ CCR7+ CD4+ клеток и CD27+ CCR7+ CD8+ клеток (соотношение CD27+ CCR7+ CD4/CD8), (2) CD45RA+ CCR7+ CD4+ клеток и CD45RA+ CCR7+ CD8+ клеток (соотношение CD45RA+ CCR7+ CD4/CD8) и (3) CD62L- CCR7+ CD4+ клеток и CD62L- CCR7+ CD8+ клеток (соотношение CD62L- CCR7+ CD4/CD8).

[0959] Композиция CAR+ Т-клеток, экспрессирующих специфический для BCMA CAR, была получена с использованием процесса, по существу, как описано в Примере 9, включая активацию, трансдукцию, размножение и криоконсервацию сконструированных клеток. Клетки в замороженной композиции оттаивали и оценивали с помощью проточной цитометрии на жизнеспособность, поверхностную экспрессию CD4 и CD8 и экспрессию CAR, с использованием реагента BCMA-Fc. Определяли соотношение жизнеспособных CAR+ клеток, которые были CD4+, и жизнеспособных CAR+ клеток, которые были CD8+ (соотношение CAR+ CD4/CD8).

[0960] Соотношение CD27+ CCR7+ CD4/CD8, соотношение CD45RA+ CCR7+ CD4/CD8 или соотношение CD62L- CCR7+ CD4/CD8 в смеси отобранных CD4 и CD8 клеток сравнивали, post facto, с соотношением CAR+ CD4/CD8 в композиции сконструированных CAR+ Т-клеток. Степень корреляции средних значений соотношений для каждого субъекта оценивали с помощью двумерного анализа, и двумерный нормальный эллипс распределения, представляющий область вероятности 0,990, для представленных данных показан на Фиг. 3A-3C. Как показано, корреляция между соотношением CD27+ CCR7+ CD4/CD8, соотношением CD45RA+ CCR7+ CD4/CD8 или соотношением CD62L-CCR7+ CD4/CD8 в исходном образце, и соотношением CAR+ CD4/CD8 в композиции Т-клеток была значимой, основываясь на корреляционном анализе по Пирсону. В Таблицах E4A-E4C показаны результаты корреляционного анализа, проведенного в отношении данных, представленным на Фиг. 3A-3C. Значимость <0,05 отмечена знаком *.

Таблица 3A: Двумерный нормальный эллипс распределения P=0,950; соотношения CD4/CD8 в исходном образце и выходной композиции клеток

Переменная	**Среднее значение**	**Станд. отклонение**	**Корреляция**	**P-значение**
Исходное соотношение (%) CD27+ CCR7+ CD4/CD8	2,689438	1,788478	0,895786	0,0064

Соотношение CAR+ CD4/CD8	2,560108	2,459516		
Таблица 3B: Двумерный нормальный эллипс распределения P=0,950; соотношения CD4/CD8 в исходном образце и выходной композиции клеток				
Переменная	**Среднее значение**	**Станд. отклонение**	**Корреляция**	**P-значение**
Исходное соотношение (%) CD45RA+ CCR7+ CD4/CD8	1,394018	0,937173	0,86723	0,0115
Отношение CAR+ CD4/CD8	2,560108	2,459516		
Таблица 3C: Двумерный нормальный эллипс распределения при P=0,950; соотношения CD4/CD8 в исходном образце и выходной композиции клеток				
Переменная	**Среднее значение**	**Станд. отклонение**	**Корреляция**	**P-значение**
Исходное соотношение (%) CD62L+ CCR7+ CD4/CD8	2,179702	1,153181	0,88584	0,0079
Соотношение CAR+ CD4/CD8	2,560108	2,456516		

Пример 13: Непрерывная визуализация в реальном масштабе времени для определения жизнеспособности клеток во время культивирования

[0961] В процессе конструирования клеток для экспрессии рекомбинантного рецептора регистрировали оптические параметры Т-клеток с использованием проточной дифференциальной цифровой голографии (DHM). Дифференциальная DHM позволяет получать высококонтрастные изображение клеток без метки для сегментирования объектов, и регистрировать многие оптические или морфологические показатели клеток, которые количественно характеризуют отображаемые объекты, например, для определения количества и жизнеспособности клеток.

[962] Первичные Т-клетки от здорового донора-человека конструировали для экспрессии химерного рецептора антигена (CAR) анти-BCMA с использованием иллюстративного процесса конструирования, описанного в Примерах 1 и 6,

представленных выше. Были проведены две экспериментальные серии процесса (серия 1, серия 2). Клетки культивировали для размножения путем переноса в биореактор (например, в биореактор с качанием). Культивирование включало замену среды полунепрерывной перфузией с постоянным перемешиванием.

[0963] Голографические изображения и оптические параметры клеток непрерывно регистрировали приблизительно в течение 120 часов культивирования с использованием встроенной системы дифференциальной визуализации DHM ("непрерывныйй" режим), например Ovizio iLine F (Ovizio Imaging Systems NV/SA, Брюссель, Бельгия). Встроенная дифференциальная система DHM содержала систему одноразовых трубок, соединенных с биореактором, и образец мог перетекать из биореактора через систему трубок, где система визуализации захватывала голографические изображения и регистрировала оптические параметры проходящих клеток, а затем образец возвращался в биореактор. Жизнеспособность клеток и количество жизнеспособных клеток (VCC) определяли по изображениям. Жизнеспособность сконструированных клеток также сравнивали с результатами, полученными путем отбора проб вручную ("ручной" режим) и подсчета клеток с использованием автоматического счетчика клеток, где пробы отбирали в различные моменты времени в течение приблизительно 120 часов культивирования. Два метода сравнивались на основе анализа показателей во времени и путем линейной регрессии.

[0964] На Фиг. 4A и 4B показано сравнение количества жизнеспособных клеток (VCC) и жизнеспособности, оцениваемых с использованием непрерывного контроля с помощью дифференциальной BDHM или ручного отбора проб в экспериментальной серии 1 (Фиг. 4A) и серии 2 (Фиг. 4B). Коэффициент R^2 и крутизна кривой сравнения показаны в Таблице E5 ниже. Разница в VCC, измеренная с использованием двух способов, находилась в пределах ожидаемой дисперсии для метода ручного отбора проб.

Таблица E5. Коэффициент R^2 и крутизна наклона регрессионной кривой сравнения методов отбора проб

Эксперимент	**R^2**		**Наклон**	
	VCC	**Жизнеспособность**	**VCC**	**Жизнеспособность**
Серия 1	0,97	0,96	0,92	0,80
Серия 2	0,99	0,98	0,94	0,98

[0965] Полученные результаты показывают, что VCC и жизнеспособность клеток, определенные при непрерывном методе контроля и при ручном взятие проб имеют высокую корреляцию. Результаты подтверждают полезность непрерывного контроля с помощью дифференциальной DHM во время культивирования клеток для их размножения клеток в процессе клеточной инженерии.

Пример 14. Сравнение ручного и автоматизированного режимов размножения клеток с использованием непрерывной проточной визуализации

[0966] Сравнивали полностью автоматизированный, не зависящий от оператора

способ размножения клеток с непрерывным контролем клеток методом проточной визуализации и с автоматизированной перфузией, со способом размножения с контролем, выполняемым оператором.

[0967] Первичные Т-клетки от здорового донора-человека активировали и трансдуцировали вектором для экспрессии химерного рецептора антигена (CAR), используя иллюстративный способ конструирования клеток. Клетки после трансдукции объединяли и инокулировали в виде двух различных культур, одна из которых использовалась в автоматизированном процессе размножения, с непрерывным формировании изображения с помощью дифференциальной DHM, а другая использовалась в процессе размножения с ручным контролем и управлением.

[0968] В автоматизированном процессе размножения клетки культивировали в биореакторе с качанием, с заменой среды полунепрерывной перфузией и с непрерывным перемешиванием. Жизнеспособность клеток и количество жизнеспособных клеток (VCC) контролировали, используя автоматическую дифференциальную систему визуализации DHM, как описано в Примере 13 выше. Исходный уровень VCC при инокуляции был сходным для обеих культур ($0{,}12 \times 10^6$ клеток/мл для культуры в автоматизированном процессе и $0{,}14 \times 10^6$ клеток/мл для культуры контролируемой вручную). Перфузия в автоматизированном процессе размножения основана на четырехчасовом цикле контроля среднего значения VCC, рассчитанного с помощью программного алгоритма, где для выполнения способа требуется среднее значение VCC, большее, чем целевое значение VCC. Целевое значение VCC составляло $0{,}6 \times 10^6$ клеток/мл, 1×10^6 клеток/мл и 4×10^6 клеток/мл для 3 стадий перфузии. После инокуляции не было никакого дополнительного вмешательства оператора. В культуре размножения с ручным контролем перфузию проводили, как правило, как описано в Примере 1 выше, с отбором одной ежедневной пробы. Клетки также оценивали на поверхностную экспрессию маркеров методом проточной цитометрии.

[0969] Как показано на Фиг.5, более высокий рост Т-клеток имел место при использовании автоматизированной системы размножения клеток. Жизнеспособность клеток, оцениваемая методом непрерывной визуализации дифференциальной DHM, и фенотипы клеток, оцениваемые методом проточной цитометрии, были схожими для клеток, которые подвергали размножения в автоматизированном и ручном процессах.

[0970] Результаты подтверждают полезность процесса непрерывной визуализации дифференциальной DHM с формированием изображения и автоматизированного процесса размножения, для культивирования и контроля клеток во время процесса размножения Т-клеток, без привлечения оператора-человека. В некоторых аспектах такой способ может быть использован для определения кинетики роста первичных Т-клеток и определения времени сбора клеток, готовых для введения субъекту.

Пример 15: Оценка композиций Т-клеток, полученных с помощью иллюстративных способов их получения

[0971] В иллюстративном процессе, как описано по существу в Примере 1, 50

образцов композиций CAR+ Т-клеток, содержащих аутологичные Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA CAR, были получены из афереза от 50 отдельных доноров (один аферез от каждого субъекта), включая 10 здоровых доноров и 40 пациентов с множественной миеломой. CD4+ и CD8+ Т-клетки отбирали из образцов афереза и отдельно замораживали. Затем клетки оттаивали, и CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки объединяли в соотношении 1:1 жизнеспособных CD4+ и CD8+ клеток. Объединенные CD4+ и CD8+ Т-клетки активировали, трансдуцировали вектором, кодирующим CAR, размножали и замораживали методом криоконсервации, как описано по существу в Примере 1

[0972] В иллюстративном альтернативном способе терапевтические Т-клеточные композиции получали способом, включающим иммуноаффинный отбор Т-клеток из образцов лейкафереза от 55 отдельных пациентов с раком. Все Т-клетки подвергали активации и трансдукции с помощью вирусного вектора, кодирующего CAR, размножали и криоконсервировали.

[0973] Клетки в замороженных композициях размораживали и оценивали методом проточной цитометрии их жизнеспособность, экспрессию маркера апоптоза, такого как активированная каспаза-3 (CAS), поверхностную экспрессию CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CCR7 и CD45RA, и CAR. В композициях определяли процент CD3+ клеток, процент клеток CAR+ негативных по маркеру апоптоза в композициях CD3+ CAR+ клеток, процент CD4+ CAR+ клеток центральной памяти и процент CD8+ CAR+ клеток центральной памяти. Определяли фенотипы клеток композиций, полученных в процессе изготовления, и в некоторых аспектах их сравнивали с фенотипом клеток композиций, полученных альтернативным способом.

[0974] Способ этого примера позволил получить композиции сконструированных клеток, удовлетворяющих заранее определенным параметрам, включая пороговые количества клеток, экспрессирующих CAR, в композициях клеток для введения пациентам, для 100% биологических образцов от человека, из которых они получены. На Фиг. 6A и 6B показаны медиана (горизонтальные линии), межквартильный диапазон (бокс) и 1,5 × интерквартильный диапазон (усы) для процентного содержания клеток указанных фенотипов (на основе экспрессии CD45RA и CCR7), среди CD4+ CAR+ клеток (Фиг. 6A) и среди CD8+ CAR+ клеток (Фиг. 6B) в соответствующих композициях, индивидуально полученных из группы образцов от 40 субъектов с множественной миеломой. На Фиг. 6C и 6D показаны медианы (горизонтальные линии), межквартильный диапазон (бокс) и 1,5 x интерквартильный диапазон (усы) для процентного содержания клеток указанных фенотипов (на основе экспрессии CD27 и CD28), среди CD4+ CAR+ клеток (Фиг. 6C) и среди CD8+ CAR+ клеток (ФИГ.6D)) в соответствующих композициях, индивидуально полученных из группы образцов от 40 субъектов с множественной миеломой. Для отдельных образцов лейкафереза, полученных от ряда пациентов с множественной миеломой, используя этот типовой способ получения композиций сконструированных клеток из таких образцов, установлено, что продолжительности части

времени процесса от начала активации до начала сбора составил от 7 до 10 дней, и средняя продолжительность процесса для этих образцов составила приблизительно 7,5 дней. Кроме того, было установлено, что среднее число кумулятивных удвоений популяции клеток в течение всего процесса для различных образцов составляло приблизительно 7,5.

[0975] В данном исследовании сконструированные популяции Т-клеток в композициях клеток, полученных в соответствии с этим иллюстративным способом, содержали менее 15% клеток, экспрессирующих маркер апоптоза, и они были обогащены клетками с центральным фенотипом памяти по сравнению с исходными образцами и с композициями клеток, полученными с использованием иллюстративного альтернативного способа.

Пример 16: Способ получения терапевтических композиций сконструированных Т-клеток, экспрессирующих анти-BCMA CAR

[0976] Иллюстративный процесс, аналогичный процессу, описанному в Примере 1, проводил к получению сконструированных композиций, содержащих CD4+ и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA химерный рецептор антигена (CAR). Первичные CD4+ и CD8+ клетки были обогащены из биологических образцов, содержащих PBMC, из образца лейкафереза человека, включая субъектов с множественной миеломой (MM). Обогащенные CD4+ и обогащенные CD8+ клеточные композиции криогенно замораживали по-отдельности, а затем их оттаивали и смешивали в соотношении 1:1 жизнеспособных CD4+ Т-клеток и жизнеспособных CD8+ Т-клеток до проведения стадий стимуляции, трансдукции и размножения.

[0977] Приблизительно 300×10^6 Т-клеток (например, 150×10^6 CD4+ и 150×10^6 CD8+ Т-клеток) из смешанной композиции клеток при плотности приблизительно 3×10^6 клеток/мл инкубировали в течение от 18 до 30 часов в присутствии покрытых полистиролом парамагнитных шариков с присоединенными анти-CD3 и анти-CD28-антителами при соотношении шариков и клеток 1:1 в бессывороточной среде (см. Пример 3), содержащей рекомбинантные2, IL-7 и IL-15.

[0978] После инкубирования по меньшей мере приблизительно 100×10^6 и вплоть до приблизительно 200×10^6 жизнеспособных клеток из инкубированной композиции клеток трансдуцировали в иллюстративных бессывороточных средах с цитокинами, с лентивирусным вектором, кодирующим анти-BCMA CAR, путем спинокуляции в течение 60 минут с последующим инкубированием приблизительно в течение от 18 до 30 часов при температуре приблизительно 37°C. CAR включал антигенсвязывающий домен scFv, специфичный для BCMA, трансмембранную область CD28, костимуляторную сигнальную область 4-1BB и внеклеточный сигнальный домен из CD3-zeta.

[0979] Затем трансдуцированные клетки размножали путем культивирования в биореакторе (например, биореакторе с качанием) в приблизительно 500 мл иллюстративной бессывороточной среды, содержащей двойные концентрации IL-2, IL-7 и IL-15, которая использовалась на стадиях инкубирования и трансдукции. Среда не

содержала полоксамера. После достижения плотности клеток более или приблизительно более 0,6 × 10^6 клеток/мл, периодически добавляли порциями свежую среду, например, в течение от приблизительно 2 до приблизительно 15 минут до объема 1000 мл, и клетки культивировали в стационарных условиях с качанием (без перфузии) до достижения пороговой плотности жизнеспособных клеток более или приблизительно более 0,6 × 10^6 клеток/мл. Если плотность жизнеспособных клеток была более 0,8 × 10^6 клеток/мл/, то начинали комбинированная стадию разбавления/перфузии, где на первой стадии среду добавляли дробным образом, как указано выше, до тех пор, пока не достигался целевой объем, равный 1000 мл, затем начинали перфузию, как объяснено ниже. Затем среду заменяли полунепрерывной перфузией с непрерывным перемешиванием. Скорость перфузии и/или скорость качания увеличивали по меньшей мере один раз во время стадии размножения, когда плотность клеток увеличивалась. Скорость перфузии увеличивали по меньшей мере один раз во время стадии размножения, когда плотность клеток увеличивалась. Среду добавляли в культуру дробным образом, с общим объемом за день, определяемым плотностью жизнеспособных клеток (с более высокими скоростями после достижения определенных плотностей), например, объемом свежей среды, добавляемой периодически в течение дня, например, приблизительно каждые 0,5 и приблизительно каждые 1,5 или 2 часа. Клетки собирали через один день после того, как общее количество нуклеированных клеток (TNC) достигало по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1000 × 10^6, и в момент времени, когда количество TNC достигало по меньшей мере или по приблизительно меньшей мере 2400 × 10^6 всех нуклеированных клеток из которых по меньшей мере 85% клеток являются жизнеспособными. После стадии сбора, из композиции клеток удаляли шарики с конъюгированными анти- CD3 и анти-CD28-антителами.

[0980] Затем из клеток готовили композицию и аликвоты композиций переносили в контейнеры, например, для последующего хранения или использования. В некоторых случаях приготовленные композиции или их части переносили в мешки для замораживания, подходящие для криоконсервирования и хранения клеточных композиций (например мешки типа CryoStore Freezing Bag), для последующего введения субъектам, и/или композиции или их части переносили во флаконы или другие контейнеры для последующего дополнительного анализа клеток. Клетки криогенно замораживали в условиях, подходящих для последующего оттаивания и применения для введения субъектам. В некоторых случаях в отдельных мешках хранили 30-миллилитровые объемы готовых клеток. В некоторых случаях клетки криоконсервировали при различных концентрациях всех клеток, например, чтобы обеспечить постоянное количество или концентрацию CAR+ Т-клеток в каждой дозе в контексте использования клеток для введения субъектам. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество клеток-мишеней CAR+ CD3+ равно или приблизительно равно желательному значению (такому как равному или приблизительно равному 37,5 × 10^6) CAR+ CD3+ клеток на 30 мл или на мешок, и в некоторых случаях общие концентрации клеток в композициях,

полученных от различных доноров или пациентов, варьировалась.

[0981] Установили, что для отдельных образцов лейкафереза, полученных от нескольких пациентов с множественной миеломой, и при использовании способа по этому примеру получали сконструированные клеточные композиции из таких образцов в течение периода времени от начала активации до сбора клеток в течение от 5 до 8 дней, при средней продолжительность этого периода для таких образцов 5,5 дней. Кроме того, установили, что среднее количество кумулятивных удвоений популяции в течение процесса для этой группы образцов должно составлять приблизительно 5.

[0982] Иллюстративный процесс в этом примере использовали для получения сконструированных композиций Т-клеток из образцов лейкоцитафераза от пациентов с миеломой. Оценивали различные параметры, включая те, которые отражают фенотип клеток, функцию и развитие клеток. Установлено, что чистота Т-клеток, однородность линии Т-клеток, уровень трансдукции и функциональность клеток по существу аналогичны показателям клеток композиций, полученных с использованием клеток лейкафереза, используя по существу способ, описанный в Примере 1. Установлено, что имело место уменьшение количества удвоений популяции и средней продолжительности времени (в днях) между началом активации и сбором клеток при выполнении процесса этого примера, по сравнению с процессом по Примеру 1. В целом, сконструированные клеточные композиции, полученные в соответствии с иллюстративным процессом этого примера, имели аналогичные или повышенные содержания (в процентах) клеток с фенотипом центральной памяти (и аналогичные или сниженные количества клеток с фенотипом эффекторной памяти), по сравнению композициями, полученными в Примере 1.

[0983] Настоящее изобретение не ограничивает свой объем конкретными раскрытыми вариантами осуществления, которые предоставлены, например, для иллюстрации различных аспектов настоящего изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из описания и представленных здесь идей. Такие вариации могут быть осуществлены без отклонения от истинного объема и сущности настоящего изобретения и, как предполагается, попадают в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения композиции сконструированных клеток, где способ включает:

(a) объединение композиции CD4+ Т-клеток и композиции CD8+ Т-клеток в соотношении CD4+ и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, получая тем самым входную композицию;

(b) инкубирование входной композиции при стимулирующих условиях, получая тем самым стимулированную композицию, где указанные условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул;

и где входная композиция содержит по меньшей мере 100×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл.

2. Способ по п.1, где CD4+ и CD8+ клетки во входной композиции обогащают или отбирают из первичной пробы от субъекта, где необязательно CD4+ и CD8+ клетки во входной композиции отдельно обогащают или отбирают из первичной пробы, полученной от субъекта.

3. Способ по п. 1 или 2, где композиция CD4+ Т-клеток включает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% CD4+ Т-клеток.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где композиция CD8+ Т-клеток включает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% CD8+ Т-клеток.

5. Способ получения композиции сконструированных клеток, где способ включает инкубирование входной композиции в условиях стимуляции, получая тем самым стимулированную композицию, где:

входная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, и где входная композиция содержит по меньшей мере 100×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл; и

условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где инкубирование осуществляют в бессывороточной среде.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где входная композиция содержит по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток, которые представляют собой CD4+ Т-клетки или CD8+ Т-клетки.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где входная композиция содержит от 100×10^6 до 500×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где входная композиция содержит или приблизительно содержит 300×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток.

10. Способ по п.9, где все CD4+ и CD8+ Т-клетки являются жизнеспособными клетками.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где входная композиция имеет концентрацию от 1×10^6 клеток/мл до 5×10^6 клеток/мл.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где входная композиция имеет концентрацию равную или приблизительно равную 3×10^6 клеток/мл.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где входная композиция имеет соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток от 1,5:1 до 1:1,5.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где входная композиция имеет соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток от 1,2:1 до 0,8:1.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где входная композиция имеет соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток равное или приблизительно равное 1:1.

16. Способ по любому из пп. 1-15, где входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CD45RA и CCR7.

17. Способ по п.16, где соотношение CD4+ клеток, поверхностно-положительных по CD45RA и CCR7, и CD8+ клеток, поверхностно-положительных по CD45RA и CCR7, равно или приблизительно равно 1,1:1.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CD27 и CCR7.

19. Способ по п.18, где соотношение CD4+ клеток, поверхностно-положительных по CD27 и CCR7, и CD8+ клеток, поверхностно-положительных по CD27 и CCR7, равно или приблизительно равно 1,69:1.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CCR7 и поверхностно-негативными по CD62L, необязательно в соотношении от 2,0:1 до 1,5:1.

21. Способ по любому из пп. 1-20, дополнительно включающий:

введение рекомбинантного рецептора в клетки из стимулированной композиции, в результате чего получают сконструированную композицию клеток, где введение включает приведение клеток стимулированной композиции в контакт с агентом, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

22. Способ по п.21, где:

контактирование осуществляют путем трансфекции вектором, где вектор представляет собой транспозон, необязательно, транспозон Sleeping Beauty (SB) или транспозон Piggybac; или

контактирование осуществляют путем трансдукции вирусным вектором.

23. Способ по любому из пп. 1-22, дополнительно включающий:

введение рекомбинантного рецептора в клетки стимулированной композиции, в результате чего получают сконструированную композицию клеток, где введение включает

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

24. Способ по любому из пп. 21-23, где введение осуществляют в бессывороточной среде.

25. Способ по любому из пп. 21-24, где используемая для введения стимулируемая композиция содержит менее 300×10^6 клеток.

26. Способ по любому из пп. 21-25, где используемая для введения стимулируемая композиция содержит от 50×10^6 клеток до 200×10^6 клеток, необязательно приблизительно 100×10^6 клеток, например, приблизительно 100×10^6 CD4+ и CD8+ Т-клеток.

27. Способ по любому из пп. 21-26, где используемая для введения стимулируемая композиция содержит по меньшей мере приблизительно 100×10^6 клеток и до приблизительно 200×10^6 клеток, например, по меньшей мере приблизительно 100×10^6 и до приблизительно 200×10^6 CD4+ и CD8+ Т-клеток.

28. Способ по любому из пп. 21-27, где используемая для введения стимулируемая композиция имеет концентрацию менее 3×10^6 клеток/мл.

29. Способ по любому из пп. 21-28, используемая для введения стимулируемая композиция имеет концентрацию от $0,5 \times 10^6$ клеток/мл до 2×10^6 клеток/мл.

30. Способ по любому из пп. 21-29, где используемая для введения стимулируемая композиция имеет концентрацию равную или приблизительно равную 1×10^6 клеток/мл.

31. Способ по любому из пп. 21-30, включающий регулирование состава стимулированной композиции после инкубирования в условиях стимуляции до введения рекомбинантного рецептора в клетки стимулированной композиции.

32. Способ по любому из пп. 21-32, где клетки стимулированной композиции являются жизнеспособными клетками.

33. Способ получения композиции сконструированных клеток, включающий введение рекомбинантного рецептора в клетки композиции Т-клеток, где указанная композиция Т-клеток имеет концентрацию по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1×10^6 жизнеспособных клеток на мл, где по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток композиции Т-клеток представляют собой CD4+ Т-клетки или CD8+ Т-клетки.

34. Способ по п.33, где концентрация клеток в композиции Т-клеток составляет менее 5×10^6 жизнеспособных клеток на мл.

35. Способ по любому из пп. 33 или 34, где композиция Т-клеток содержит по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или приблизительно 100×10^6 жизнеспособных клеток, или где композиция Т-клеток содержит от меньшей мере приблизительно 100×10^6 жизнеспособных клеток до приблизительно 200×10^6 жизнеспособных клеток.

36. Способ по любому из пп. 33-35, где композиция Т-клеток содержит менее 300×10^6 жизнеспособных клеток.

37. Способ по любому из пп. 33-36, где введение включает контактирование Т-клеток путем трансдукции вирусного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

38. Способ по любому из пп. 33-37, где введение осуществляют в бессывороточной среде.

39. Способ по любому из пп. 33-38, где одна или несколько клеток композиции Т-клеток активированы и/или поверхностною экспрессируют рецептор LDL.

40. Способ по любому из пп. 33-39, где по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% или по меньшей мере 60% клеток композиции клеток:

(i) экспрессируют поверхностный маркер, выбранный из группы, состоящей из HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L и 4-1BB;

(ii) внутриклеточно экспрессируют цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамаа, TNF-альфа;

(iii) находятся в фазе G1 или более поздней фазе клеточного цикла; и/или

(iv) способны пролиферировать.

41. Способ по любому из пп. 33-40, где клетки композиции перед введением получают способом, включающим инкубирование входной композиции, содержащей CD4+ и CD8+ Т-клетки, в условиях стимуляции, где указанные условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул

42. Способ по п.41, где инкубирование проводят в бессывороточной среде, и введение необязательно осуществляют в бессывороточной среде с таким же или другим составом, как у бессывороточной среды, использованной для инкубирования.

43. Способ получения композиции сконструированных клеток, включающий:

(a) инкубирование входной композиции в условиях стимуляции, получая тем самым стимулированную композицию, где:

входная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, и она содержит по меньшей мере 100×10^6 CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл; и

условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул; и

(b) введение рекомбинантного рецептора в менее чем 300×10^6 клеток стимулированной композиции, в результате чего образуется сконструированная композиция клеток, где введение включает контактирование клеток стимулированной композиции с вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий

рекомбинантный рецептор.

44. Способ по п.43, где инкубирование и/или введение осуществляют в бессывороточной среде.

45. Способ по любому из пп. 43 или 44, где CD4+ и CD8+ Т-клетки являются жизнеспособными клетками.

46. Способ по любому из пп. 44, где клетки из стимулированной композиции являются жизнеспособными клетками.

47. Способ по любому из пп. 33-46, где введение инициируют в течение 2 дней после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 2 дней после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

48. Способ по любому из пп. 33-47, где введение инициируют в течение 36 часов после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 36 часов после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

49. Способ по любому из пп. 33-48, где введение инициируют в течение 30 часов после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 30 часов после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

50. Способ по любому из пп. 33-49, дополнительно включающий культивирование сконструированной композиции в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение сконструированных клеток, в результате чего получают выходную композицию, содержащую сконструированные Т-клетки.

51. Способ по п.50, где культивирование осуществляют в бессывороточной среде.

52. Способ получения композиции сконструированных клеток, включающий:

(a) инкубирование входной композиции в условиях стимуляции с образованием стимулированной композиции; где входная композиция имеет соотношение CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток от 2:1 до 1:2, и где входная композиция содержит по меньшей мере 100×10^6 всех CD4+ и CD8+ Т-клеток при концентрации менее 5×10^6 клеток/мл, и где указанные условия стимуляции включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и/или одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул;

(b) введение рекомбинантного рецептора в менее чем 300×10^6 клеток стимулированной композиции, в результате чего получают сконструированную композицию клеток, где введение включает трансдукцию клеток стимулированной композиции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор; и

(c) культивирование сконструированной композиции в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение сконструированных клеток, в результате чего получают выходную композицию, содержащую сконструированные Т-клетки.

53. Способ по п.52, где одну, две или все стадии инкубирования, введения и/или культивирования проводят в бессывороточной среде или в бессывороточных средах, где

бессывороточные среды необязательно имеют одинаковый состав или различные составы.

54. Способ по п.41-53, где входная композиция имеет соотношение CD4+ клеток и CD8+ клеток от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,2:1 до 0,8:1, необязательно 1:1 или приблизительно 1:1.

55. Способ по любому из пп. 41-54, где входная композиция содержит CD4+ и CD8+, которые являются поверхностно-положительными по CD45RA и CCR7.

56. Способ по п.55, где соотношение CD4+ клеток, поверхностно-положительных по CD45RA и CCR7, и CD8+ клеток, поверхностно-положительных по CD45RA и CCR7, равно или приблизительно равно 1,1:1.

57. Способ по любому из пп. 41-56, где входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CD27 и CCR7.

58. Способ по п.57, где соотношение CD4+ клеток, поверхностно-положительных по CD27 и CCR7, и CD8+ клеток, поверхностно-положительных по CD27 и CCR7, равно или приблизительно равно 1,69:1.

59. Способ по любому из пп. 41-58, где входная композиция содержит CD4+ и CD8+ клетки, которые являются поверхностно-положительными по CCR7 и поверхностно-негативными по CD62L.

60. Способ по любому из пп. 43-59, где стимулируемая композиция для введения содержит менее 300×10^6 клеток, необязательно от 50×10^6 жизнеспособных клеток до 200×10^6 жизнеспособных клеток, и, необязательно, 100×10^6 или приблизительно 100×10^6 жизнеспособных клеток.

61. Способ по любому из пп. 43-59, где стимулируемая композиция для введения содержит по меньшей мере от приблизительно 100×10^6 жизнеспособных клеток до приблизительно 200×10^6 жизнеспособных клеток.

62. Способ по любому из пп. 43-61, где стимулируемая композиция для введения имеет концентрацию менее 3×10^6 клеток/мл.

63. Способ по любому из пп. 43-62, стимулируемая композиция для введения имеет концентрацию от $0,5 \times 10^6$ клеток/мл до 2×10^6 клеток/мл, необязательно 1×10^6 клеток/мл или приблизительно 1×10^6 клеток/мл.

64. Способ по любому из пп. 43-63, где состав стимулированной композиции регулируют после инкубирования в условиях стимуляции до введения рекомбинантного рецептора в клетки стимулированной композиции.

65. Способ по любому из пп. 1-64, где инкубирование осуществляют в присутствии одного или нескольких цитокинов, необязательно в бессывороточной среде.

66. Способ по п.65, где один или несколько цитокинов выбирают из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

67. Способ по п.66, где один или несколько цитокинов включают: от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и/или от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

68. Способ по п.66 или 67, где один или несколько цитокинов включают: от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и

от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

69. Способ по любому из пп. 1-68, где по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% или по меньшей мере 60% клеток стимулированной композиции:

(i) экспрессируют поверхностный маркер, выбранный из группы, состоящей из HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L и 4-1 BB;

(ii) внутриклеточно экспрессируют цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма, TNF-альфа;

(iii) находятся в фазе G1 или более поздней фазе клеточного цикла; и/или

(iv) способны пролиферировать.

70. Способ по любому из пп. 1-69, где стимулирующий реагент содержит первичный агент, который специфически связывается с компонентом комплекса TCR, который необязательно специфически связывается с CD3.

71. Способ по п.70, где стимулирующий реагент дополнительно содержит вторичный агент, который специфически связывается с костимуляторной молекулой Т-клеток, где костимуляторная молекула необязательно выбрана из CD28, CD137 (4-L-BB), OX40 или ICOS.

72. Способ по п. 70 или 71, где первичный и/или вторичный агенты содержат антитело, и стимулирующий реагент необязательно включает инкубирование с анти-CD3-антителом и анти-CD28-антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

73. Способ по любому из пп. 71-72, где первичный агент и/или вторичный агент присутствуют на поверхности твердого носителя.

74. Способ по п.73, где твердый носитель представляет собой или содержит шарик.

75. Способ по п.74, где шарик имеет диаметр больше или больше приблизительно 3,5 мкм, но не более чем приблизительно 9 мкм, или не более чем приблизительно 8 мкм, или не более чем приблизительно 7 мкм, или не более чем приблизительно 6 мкм, или не более чем приблизительно 5 мкм.

76. Способ по п.74 или варианту осуществления 75, где шарик имеет диаметр равный или приблизительно равный 4,5 мкм.

77. Способ по любому из пп. 74-76, где шарик является инертным.

78. Способ по любому из пп. 74-77, где шарик состоит из полистирола или имеет поверхность из полистирола.

79. Способ по любому из пп. 74-78, где шарик является магнитным или сверхпарамагнитным.

80. Способ по любому из пп. 74-79, где соотношение шариков и клеток составляет менее 3:1.

81. Способ по любому из пп. 74-80, где соотношение шариков и клеток составляет от приблизительно 2:1 до 0,5:1, и необязательно равно или приблизительно равно 1:1.

82. Способ по любому из пп. 71-72, где первичный агент и вторичный агент обратимо связаны с олигомерным реагентом на поверхности частиц, где олигомерный

реагент содержит множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина.

83. Способ по любому из пп. 1-82, где входную композицию инкубируют при стимулирующих условиях в течение менее 48 часов.

84. Способ по любому из пп. 1-83, где входную композицию инкубируют при стимулирующих условиях в течение от 12 часов до 36 часов включительно.

85. Способ по любому из пп. 1-84, где входную композицию инкубируют при стимулирующих условиях в течение от 18 часов до 30 часов включительно.

86. Способ по любому из пп. осуществления 1-85, где входную композицию инкубируют при стимулирующих условиях в течение или приблизительно в течение 24 часов.

87. Способ по любому из пп. 23-86, где контактирование, необязательно трансдукцию, проводят в течение менее чем 48 часов.

88. Способ по любому из пп. 23-87, где контактирование, необязательно трансдукцию, проводят в пределах от 12 часов до 36 часов включительно.

89. Способ по любому из пп. 23-88, где контактирование, необязательно трансдукцию, проводят в течение от 18 часов до 30 часов включительно.

90. Способ по любому из пп. 23-89, где контактирование, необязательно трансдукцию, проводят в течение или приблизительно в течение 24 часов.

91. Способ по любому из пп. 23-90, где вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

92. Способ по любому из пп. 23-91, где вирусным вектором является лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор.

93. Способ по любому из пп. 23-92, где контактирование, необязательно трансдукцию, осуществляют в отсутствие адъюванта трансдукции.

94. Способ по любому из пп. 23-93, где введение осуществляют в присутствии одного или нескольких цитокинов.

95. Способ по п.94, где один или несколько цитокинов выбирают из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

96. Способ по п. 94 или 95, где один или несколько цитокинов содержат: от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и/или от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

97. Способ по любому из пп. 94-96, где один или несколько цитокинов включают: от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и от 10 до 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

98. Способ по любому из пп. 50-97, где по меньшей мере часть культивирования осуществляют путем смешивания и/или перфузии.

99. Способ по п.98, где по меньшей мере часть культивирования осуществляют со скоростью перфузии равной, приблизительно равной или по меньшей мере равной 500 мл/день, 600 мл/день, 700 мл/день, 750 мл/день, 800 мл/день, 900 мл/день, 1000 мл/день, 1200 мл/день, 1400 мл/день, 1500 мл/день, 1600 мл/день, 1800 мл/день и/или 2000 мл/день.

100. Способ по п. 98 или 99, где по меньшей мере первую часть культивирования выполняют со скоростью перфузии равной, приблизительно равной или по меньшей мере равной 500 мл/день, 750 мл/день или 1000 мл/день, и где по меньшей мере вторая часть культивирования выполняют со скоростью перфузии равной, приблизительно равной или по меньшей мере равной 1200 мл/день, 1400 мл/день или 1500 мл/день.

101. Способ по любому из пп. 98-100, где перфузию инициируют и/или увеличивают, когда клетки достигают определенной плотности.

102. Способ по п.101, где определенная плотность клеток равна, приблизительно равна или составляет по меньшей мере $0,4 \times 10^6$ клеток, $0,5 \times 10^6$ клеток, $0,6 \times 10^6$ клеток, $0,8 \times 10^6$ клеток, $1,0 \times 10^6$ клеток, $1,2 \times 10^6$ клеток, $1,4 \times 10^6$ клеток, $1,6 \times 10^6$ клеток, $1,8 \times 10^6$ клеток, $2,0 \times 10^6$ клеток, $2,2 \times 10^6$ клеток или $2,4 \times 10^6$ клеток.

103. Способ по любому из пп. 98-102, где перфузию инициируют и/или увеличивают до скорости равной или приблизительно равной 750 мл/день, когда клетки достигают плотности равной или приблизительно равной $0,6 \times 10^6$ клеток/мл.

104. Способ по п.98, где перфузию инициируют и/или увеличивают до скорости равной или приблизительно равной 1500 мл/день, когда клетки достигают плотности равной или приблизительно равной $2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

105. Способ по любому из пп. 50-104, где культивирование осуществляют в присутствии одного или нескольких цитокинов, необязательно в бессывороточной среде.

106. Способ по п.105, где один или несколько цитокинов выбирают из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

107. Способ по п.105 или 10^6, где один или несколько цитокинов включают: от 50 до 400 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и/или от 50 до 400 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

108. Способ по любому из пп. 105-107, где один или несколько цитокинов включают: от 50 до 400 МЕ/мл рекомбинантного IL-2; от 100 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл рекомбинантного IL-7; и от 50 до 400 МЕ/мл рекомбинантного IL-15.

109. Способ по любому из пп. 50-108, где культивирование инициируют в течение 3 дней после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 3 дней после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

110. Способ по любому из пп. 50-109, где культивирование инициируют в течение 60 часов после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 60 часов после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

111. Способ по любому из пп. 50-110, где культивирование инициируют в течение 48 часов после начала инкубирования в условиях стимуляции и/или в течение 48 часов после объединения CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток входной композиции.

112. Способ по любому из пп. 50-111, где культивирование осуществляют по меньшей мере до тех пор, пока композиция не достигнет порогового количества Т-клеток, порогового количества жизнеспособных Т-клеток, пороговой концентрации Т-клеток, пороговой концентрации жизнеспособных Т-клеток.

113. Способ по п.112, где пороговое количество Т-клеток или пороговое количество жизнеспособных Т-клеток равно, приблизительно равно или по меньшей мере равно 2400×10^6 или 5500×10^6 всего количества нуклеированных клеток, где жизнеспособность всех нуклеированных клеток необязательно приблизительно равна или по меньшей мере приблизительно равна 75% или приблизительно равна или по меньшей мере приблизительно равна 85%.

114. Способ по п.112, где культивирование продолжают в течение по меньшей мере одного дня после достижения порогового количества Т-клеток, порогового количества жизнеспособных Т-клеток, пороговой концентрации Т-клеток, пороговой концентрации жизнеспособных Т-клеток, где пороговое количество Т-клеток или пороговое количество жизнеспособных Т-клеток приблизительно равно или по меньшей мере равно 900×10^6, 1200×10^6 или 3500×10^6 всего количества нуклеированных клеток.

115. Способ по любому из пп. 50-114, где пороговое количество Т-клеток равно или приблизительно равно 2400×10^6 всего количества нуклеированных клеток, и жизнеспособность всех нуклеированных клеток приблизительно равна или по меньшей мере приблизительно равна 85%.

116. Способ по любому из пп. 50-114, где пороговое количество Т-клеток равно, приблизительно равно 5500×10^6 всех нуклеированных клеток.

117. Способ по любому из пп. 50-116, включающий сбор клеток выходной композиции после культивирования.

118. Способ по любому из пп. 50-117, включающий сбор клеток выходной композиции после культивирования, где клетки выходной композиции собирают по меньшей мере через 9 дней после начала инкубирования в условиях стимуляции.

119. Способ по любому из пп. 50-118, включающий сбор клеток выходной композиции после культивирования, где клетки выходной композиции собирают по меньшей мере через 10 дней после начала инкубирования в условиях стимуляции.

120. Способ по п. 118 или 119, включающий 95% доверительный интервал времени между началом инкубирования и сбора клеток выходной композиции, где интервал времени между началом инкубирования и сбора клеток выходной композиции находится в пределах от 8 до 25 дней, необязательно от 14 до 18 дней.

121. Способ по п.118 или 119, включающий 95% доверительный интервал времени между началом инкубирования и сбора клеток выходной композиции, где интервал времени между началом инкубирования и сбора клеток выходной композиции находится в пределах от 9 до 21 дня.

122. Способ по п.118 или 119, включающий 95% доверительный интервал времени между началом инкубирования и собирающими клетками выходной композиции, где интервал времени между началом инкубирования и сбора клеток выходной композиции находится в пределах от 9 до 16 дней.

123. Способ по любому из пп. 52-122, дополнительно включающий подготовку клеток выходной композиции для криоконсервирования и/или для введения субъекту,

необязательно в присутствии фармацевтически приемлемого эксципиента.

124. Способ по п.123 осуществления, где подготовку клеток выходной композиции осуществляют в присутствии криопротектора.

125. Способ по п.124, где криопротектор включает DMSO.

126. Способ по любому из пп. 122-124, где клетки выходной композиции помещают в контейнер, необязательно во флакон или мешок.

127. Способ по любому из пп. 1-126, дополнительно включающий выделение CD4+ и/или CD8+ Т-клеток из биологического образца перед инкубированием.

128. Способ по п.127, где выделение включает отбор клеток на основе поверхностной экспрессии CD4 и/или CD8, необязательно путем положительного или негативного отбора.

129. Способ по п. 127 или 128, где выделение включает проведение отбора методом иммуноаффинной хроматографии.

130. Способ по любому из пп. 127-129, где биологический образец содержит первичные Т-клетки, полученные от субъекта.

131. Способ по п.130, где субъектом является человек.

132. Способ по любому из пп. 127-131, где биологический образец представляет собой или содержит образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), образец нефракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкаферза.

133. Способ по любому из пп. 1-132, где рекомбинантный рецептор способен связываться с антигеном-мишенью, который связан, специфичен и/или экспрессируется на клетке или в ткани при заболевании, расстройстве или состоянии.

134. Способ по п.133, где заболевание, расстройство или состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или рак.

135. Способ по п. 133 или 134, где антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

136. Способ по любому из пп. 133-135, где антиген-мишень выбирают из 5T4, 8H9, avb6 интегрина, B7-H6, антигена созревания B-клеток (BCMA), CA9, антигена рака яичек, карбоангидразы 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, поверхностного антигена гепатита B, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, протеогликана 4 хондроитинсульфата (CSPG4), карциноэмбрионального антигена (CEA), CE7, циклина, циклина a2, c-Met, двойного антигена, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), EPHa2, ephrin2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, рецептора эстрогена, фетального AchR, фолат-рецептора альфа, фолат-связывающего белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального ацетилхолинового рецептора, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, глипиканА-3 (GPC3), G-белка, сопряженного с рецептором семейства C группы 5, члена D

(GPRC5D), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), HMW-MAA, IL-22R-альфа, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Rα2), рецептора домена вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, молекулы адгезии L1-клетки (L1-CAM), ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, MAGE-A10, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, O-ацетилированного GD2 (OGD2), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), PSCA, рецептора прогестерона, сурвивина, ROR1, TAG72, связанного с тирозиназой белка 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), связанного с тирозиназой белка 2 (TRP2, также известный как допахром-таутомераза, допахром-дельта-изомераза или DCT), рецепторов VEGF, VEGF-R2, опухоли Вильмса 1 (WT-1), антиген-специфического антигена и антигена, связанного с универсальной меткой.

137. Способ по любому из пп. 1-136, где рекомбинантный рецептор представляет собой или включает функциональный антигенный рецептор, не являющийся TCR, или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

138. Способ по любому из пп. 1-137, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

139. Способ по любому из пп. 1-138, где рекомбинантный рецептор представляет собой анти-BCMA CAR.

140. Способ по п. 138 или 139, где химерный рецептор антигена включает внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен.

141. Способ по п.140, где антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или фрагмент антитела, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент.

142. Способ по п.141, где фрагмент содержит вариабельные области антитела, соединенные гибким линкером.

143. Способ по п. 141 или 142, где фрагмент включает scFv.

144. Способ по любому из пп. 138-143, где химерный рецептор антигена дополнительно включает спейсер и/или шарнирную область.

145. Способ по любому из пп. 138-144, где химерный рецептор антигена включает внутриклеточную сигнальную область.

146. Способ по п.145, где внутриклеточная сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен.

147. Способ по п.146, где внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен индуцировать первичный активационный сигнал в Т-клетке, сигнальный домен Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий мотив активации иммунорецепторов на основе тирозина (ITAM)

148. Способ по п. 146 или 147, где внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или включает внутриклеточный сигнальный домен CD3-цепи,

необязательно цепи CD3-zeta (CD3ζ), или его сигнальную часть.

149. Способ по любому из пп. 145-148, где химерный рецептор антигена дополнительно включает трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

150. Способ по любому из пп. 145-149, где внутриклеточная сигнальная область дополнительно включает костимуляторную сигнальную область.

151. Способ по п.150, где костимуляторная сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен костимуляторной молекулы Т-клеток или его сигнальную часть.

152. Способ по п. 150 или 151, где костимуляторная сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или его сигнальную часть.

153. Способ по любому из пп. 150-152, где костимуляторная сигнальная область находится между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью.

154. Способ по любому из пп. 113-153, где выходную композицию, содержащую пороговое количество или большее количество клеток, получают в пределах более чем или более чем приблизительно 85%, более или более чем приблизительно 90% или более или более чем приблизительно 95% итераций способа.

155. Способ по любому из пп. 1-154, где бессывороточная среда содержит:

от 0,5 мМ до 5 мМ дипептидной формы L-глутамина в основной среде;

от 0,5 мМ до 5 мМ L-глутамина; и

по меньшей мере один белок, где среда не содержит сыворотки.

156. Способ по п.155, где дипептидная форма L-глутамина представляет собой L-аланил-L-глутамин.

157. Способ по п. 155 или 156, где концентрация дипептидной формы L-глутамина в бессывороточной среде равна или приблизительно равна 2 мМ.

158. Способ по любому из пп. 155-157, где концентрация L-глутамина в бессывороточной среде равна или приблизительно равна 2 мМ.

159. Способ по любому из пп. 155-158, где по меньшей мере один белок содержит одно или несколько из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно одно или несколько из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

160. Композиция, содержащая сконструированные клетки, полученные способом по любому из пп. 1-159 или 165-177.

161. Композиция по п.160, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

162. Композиция по п. 160 или 161, содержащая криопротектор, необязательно DMSO.

163. Изделие, содержащее композицию по любому из пп. 160-162 и инструкции для введения выходной композиции субъекту.

164. Изделие по п.163, где субъект имеет заболевание или состояние, при котором

необязательно рекомбинантный рецептор специфически распознает или специфически связывается с антигеном, ассоциированным с или экспрессируемым или присутствующим на клетках при заболевании или состоянии.

165. Способ по любому из пп. 55-159, где во время по меньшей мере части культивирования клетки контролируют в отношении жизнеспособности, концентрации, плотности, количества клеток или в отношении комбинации этих показателей.

166. Способ по п.165, где контроль осуществляют оптическим методом, необязательно микроскопией.

167. Способ по п.165 или 166, где контроль выполняют с помощью микроскопии в светлом поле, флуоресцентной микроскопии, дифференциальной интерференционной контрастной микроскопии, фазоконтрастной микроскопии, цифровой голографии (DHM), дифференциальной цифровой голографии (DDHM) или их комбинации.

168. Способ по любому из пп. 165-167, где контроль осуществляют посредством дифференциальной цифровой голографии (DDHM).

169. Способ по любому из пп. 165-168, где контроль проводят периодически или непрерывно в течение по меньшей мере части времени культивирования, и, необязательно, его проводят по меньшей мере каждые 1 час, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа или 26 часов во время культивирования.

170. Способ по любому из пп. 165-169, где контроль проводят до тех пор, пока клетки не достигнут порогового количества Т-клеток, порогового количества жизнеспособных Т-клеток, пороговой концентрации Т-клеток или пороговой концентрации жизнеспособных Т-клеток.

171. Способ по любому из пп. 165-170, где контроль и культивирование проводят в закрытой системе.

172. Способ по любому из пп. 50-159 и 165-171, где по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в выходной композиции представляют собой клетки с фенотипом памяти; по меньшей мере, 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более 95% клеток в выходной композиции представляют собой клетки с фенотипом центральной памяти; по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в выходной композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B- и/или CD127+ клетки; и/или

где по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%,

по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более 95% клеток в выходной композиции представляют собой CCR7+/CD45RA- клетки или представляют собой CCR7+/CD45RO+ клетки.

173. Способ по любому из пп. 50-159 и 165-172, где итерации способа дают несколько выходных композиций, необязательно из биологических образцов человека, где способ осуществляют среди множества различных отдельных субъектов, где:

средний процент клеток с фенотипом памяти в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%;

средний процент клеток с фенотипом центральной памяти в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%;

средний процент клеток, которые представляют собой CD27+, CD45RO+, CD62L+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B- и/или CD127+ клетки в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%;

средний процент клеток, которые представляют собой CCR7+/CD45RA- или CCR7+/CD45RO+ в нескольких выходных композициях, составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60% или от приблизительно 60% до приблизительно 65%;

средний процент CD4+ Т-клеток с центральной памятью в созданных CD4+ Т-клетках, необязательно CAR+ CD4+ Т-клетках, в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%;

средний процент CD8+ Т-клеток с центральной памятью в созданных CD8+ Т-клетках, необязательно CAR+ CD8+ Т-клетках, в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от

приблизительно 55% до приблизительно 60%, или от приблизительно 60% до приблизительно 65%; и/или

средний процент Т-клеток с центральной памятью, необязательно CD4+ Т-клеток с центральной памятью и CD8+ Т-клеток с центральной памятью, в сконструированных Т-клетках, необязательно CAR+ Т-клетках, в нескольких выходных композициях составляет от приблизительно 40% до приблизительно 65%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 55% до приблизительно 60% или от приблизительно 60% до приблизительно 65%.

174. Способ по любому из пп. 1-159 и 165-173, где способы обеспечивают получение выходных композиций, имеющих предварительно заданный признак, необязательно такой как пороговое количество клеток, экспрессирующих CAR, в выходной композиции, в по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 99%, приблизительно 100% или 100% биологических образцах, полученных от человека, где образцы получены от множества различных отдельных субъектов.

175. Способ по п.174, где множество различных субъектов включают субъекты, имеющие заболевание или состояние.

176. Способ по п.175, где заболевание или состояние представляет собой рак.

177. Способ по п.176, где рак представляет собой гематологический рак, необязательно множественную миелому.

178. Композиция по п.160, в которой:

по меньшей мере, 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более 95% клеток в композиции представляют собой клетки с фенотипом памяти;

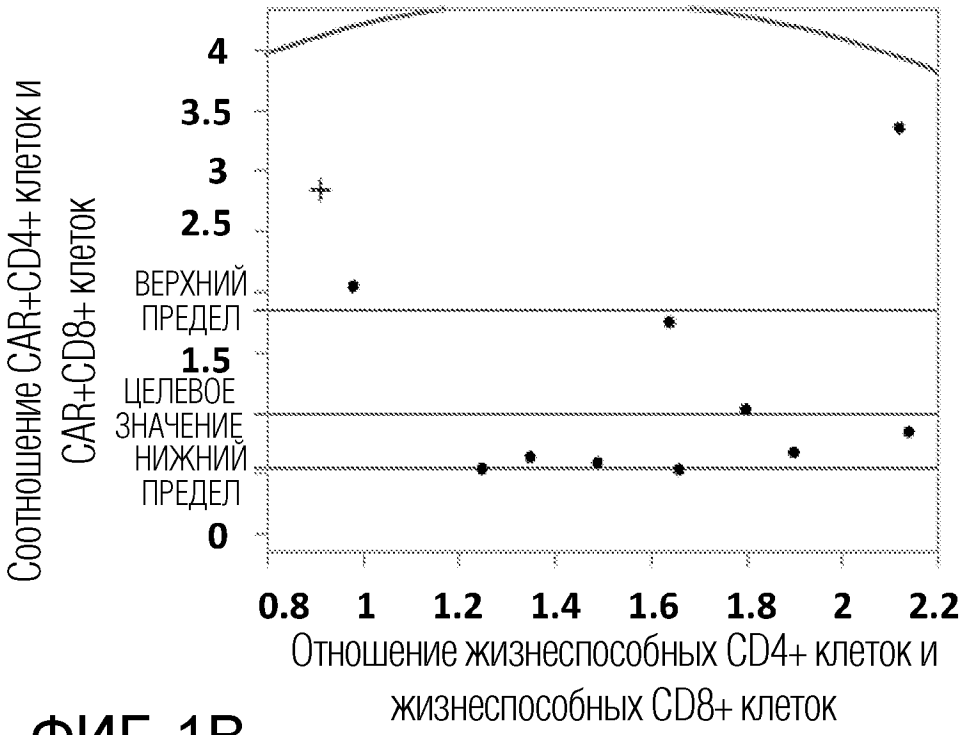
по меньшей мере, 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в композиции представляют собой клетки с фенотипом центральной памяти;

по меньшей мере, 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, гранзим B- и/или CD127+ клетки; и/или

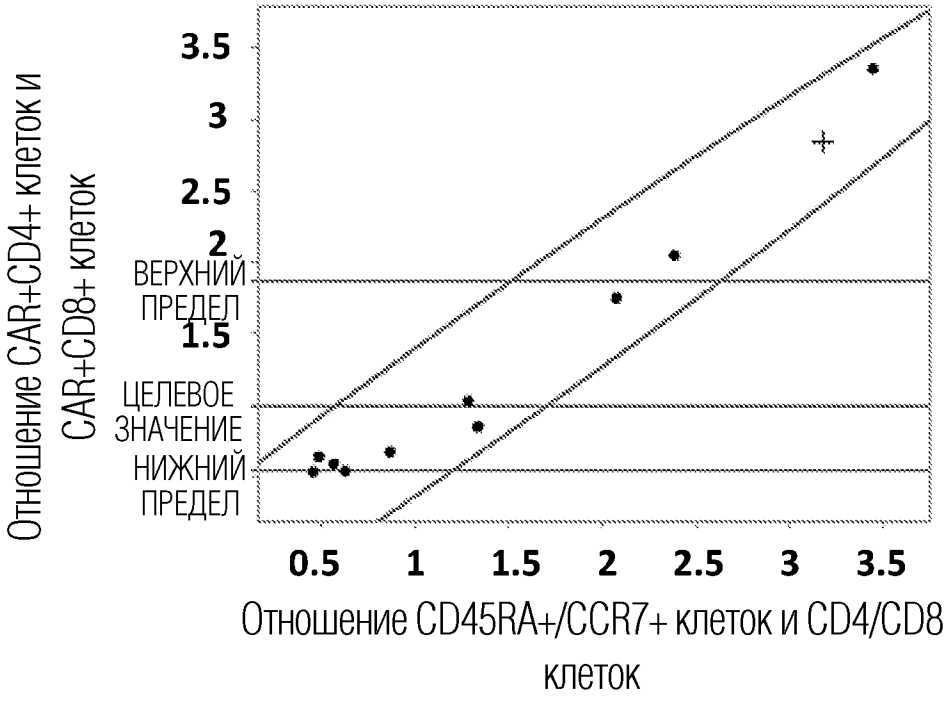
по меньшей мере, 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток в выходной композиции представляют собой CCR7+/CD45RA- или CCR7+/CD45RO+ клетки.

По доверенности

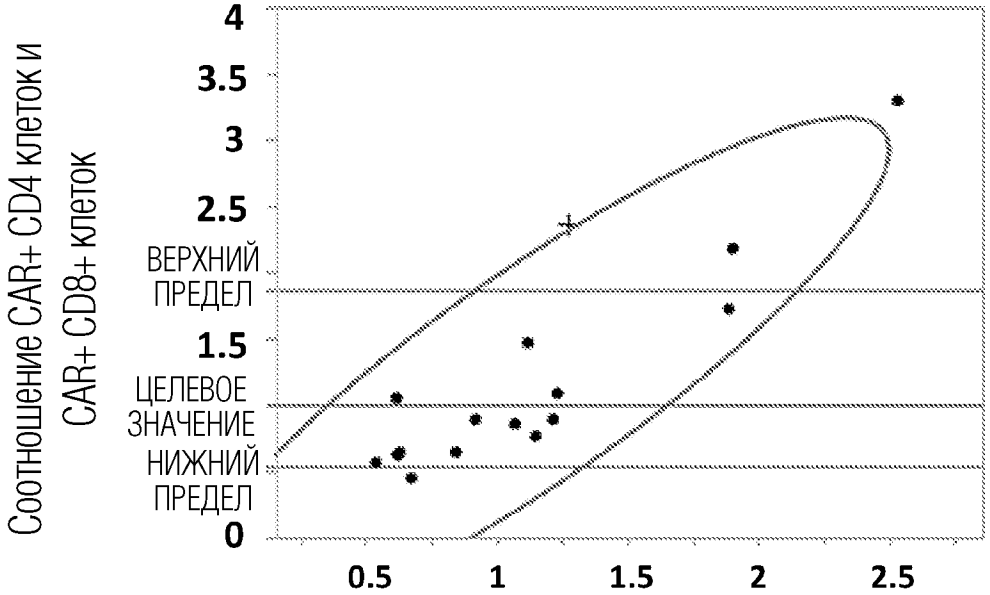
ФИГ. 1A


Соотношение CAR+CD4+ клеток и CAR+CD8+ клеток
4
3.5
3
2.5
ВЕРХНИЙ ПРЕДЕЛ
1.5
ЦЕЛЕВОЕ ЗНАЧЕНИЕ
НИЖНИЙ ПРЕДЕЛ
0
0.8
1
1.2
1.4
1.6
1.8
2
2.2
Отношение жизнеспособных CD4+ клеток и жизнеспособных CD8+ клеток

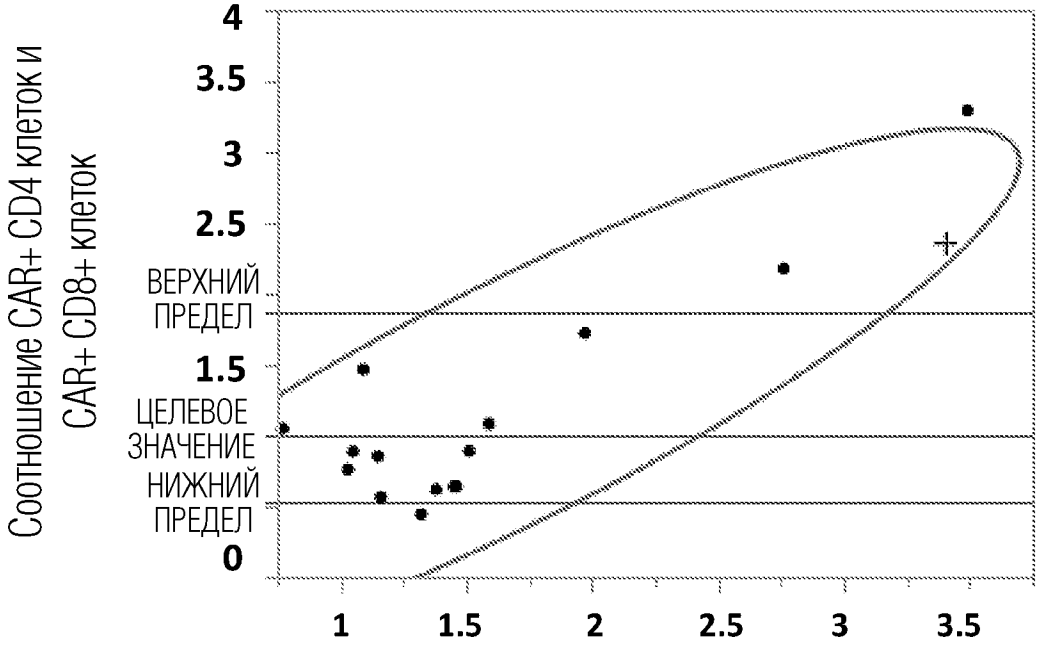
ФИГ. 1B


Отношение CAR+CD4+ клеток и CAR+CD8+ клеток
3.5
3
2.5
2
ВЕРХНИЙ ПРЕДЕЛ
1.5
ЦЕЛЕВОЕ ЗНАЧЕНИЕ
НИЖНИЙ ПРЕДЕЛ
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
Отношение CD45RA+/CCR7+ клеток и CD4/CD8 клеток

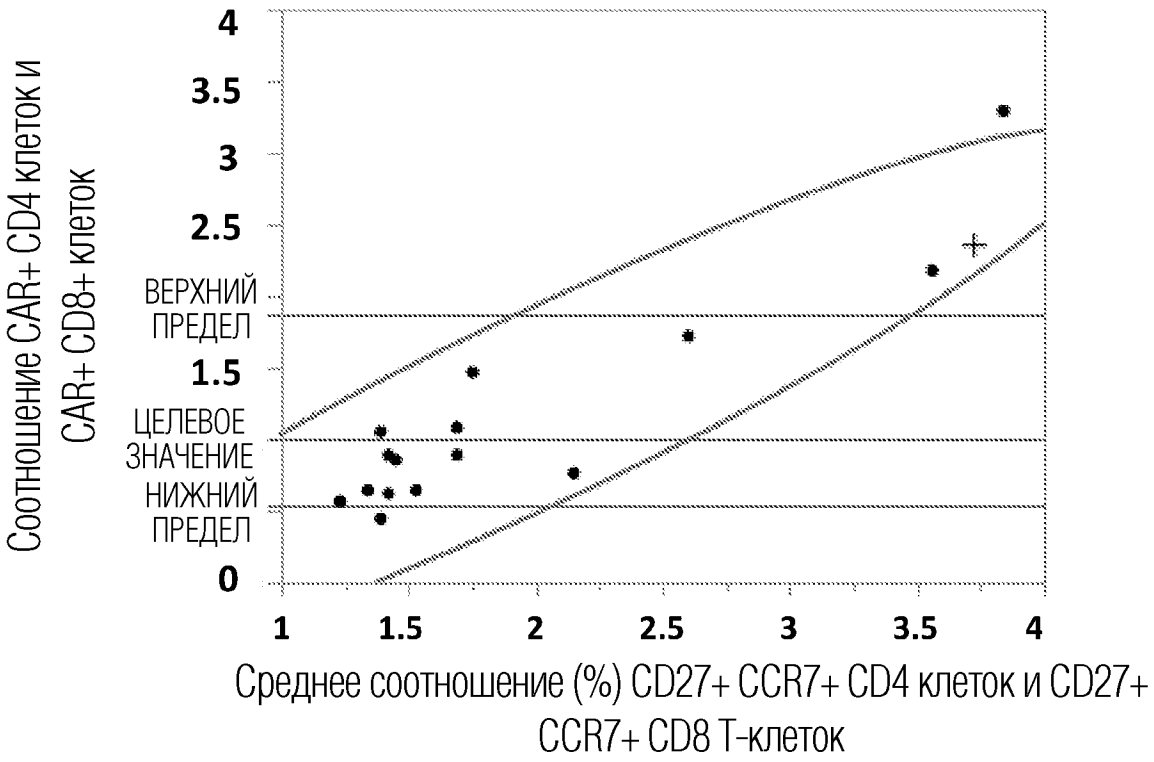
ФИГ. 2A


Соотношение CAR+ CD4 клеток и CAR+ CD8+ клеток
4
3.5
3
2.5
ВЕРХНИЙ ПРЕДЕЛ
1.5
ЦЕЛЕВОЕ ЗНАЧЕНИЕ
НИЖНИЙ ПРЕДЕЛ
0
0.5
1
1.5
2
2.5
Среднее соотношение CD45RA+/CCR7+ CD4 клеток и CD45RA+/CCR7+ CD8 клеток в зависимости от донора

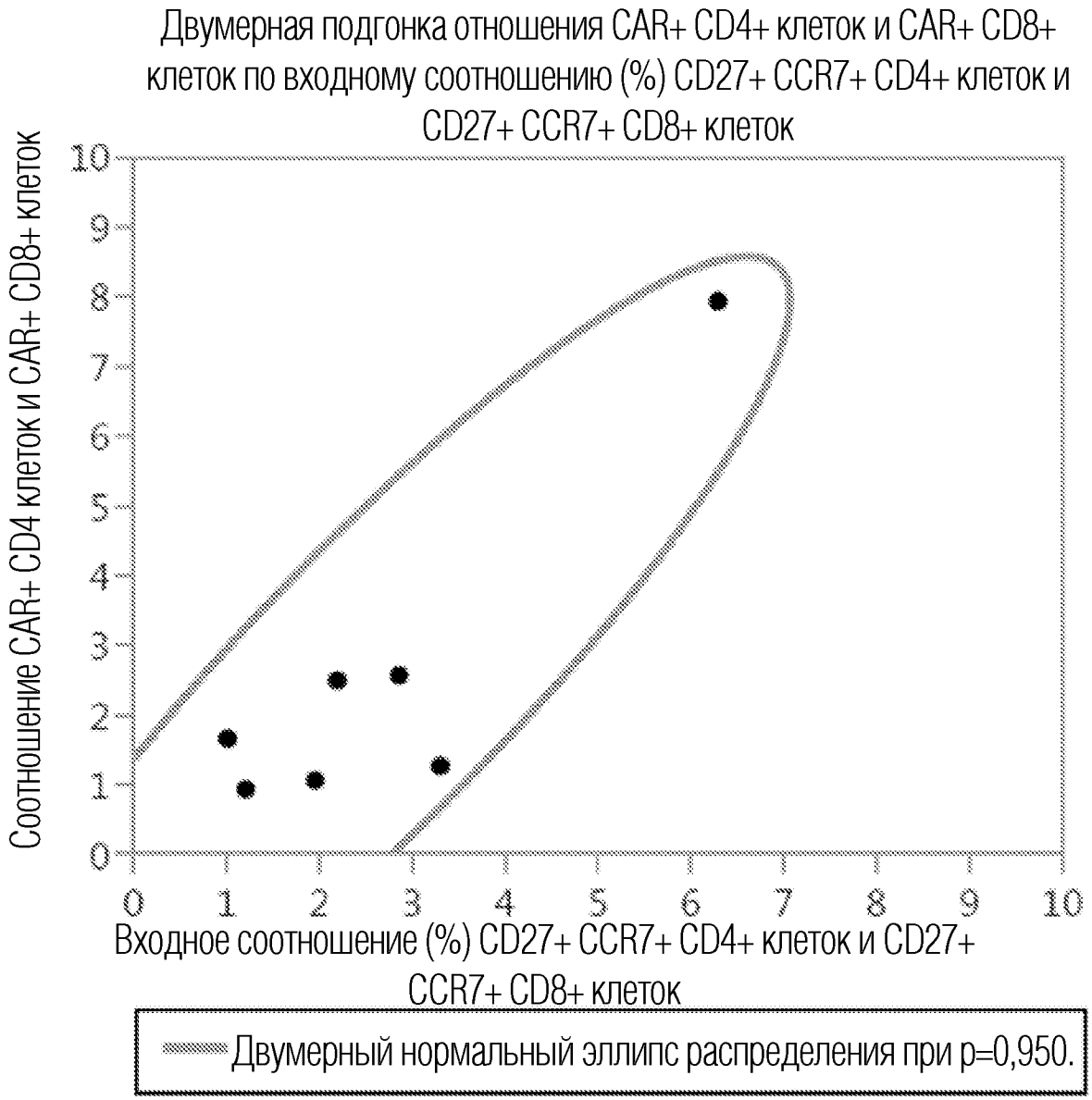
ФИГ. 2B


Соотношение CAR+ CD4 клеток и CAR+ CD8+ клеток
4
3.5
3
2.5
ВЕРХНИЙ ПРЕДЕЛ
1.5
ЦЕЛЕВОЕ ЗНАЧЕНИЕ
НИЖНИЙ ПРЕДЕЛ
0
1
1.5
2
2.5
3
3.5
Среднее соотношение (%) CD62L-/CCR7+ CD4 клеток и CD62L-/CCR7+ CD8 клеток

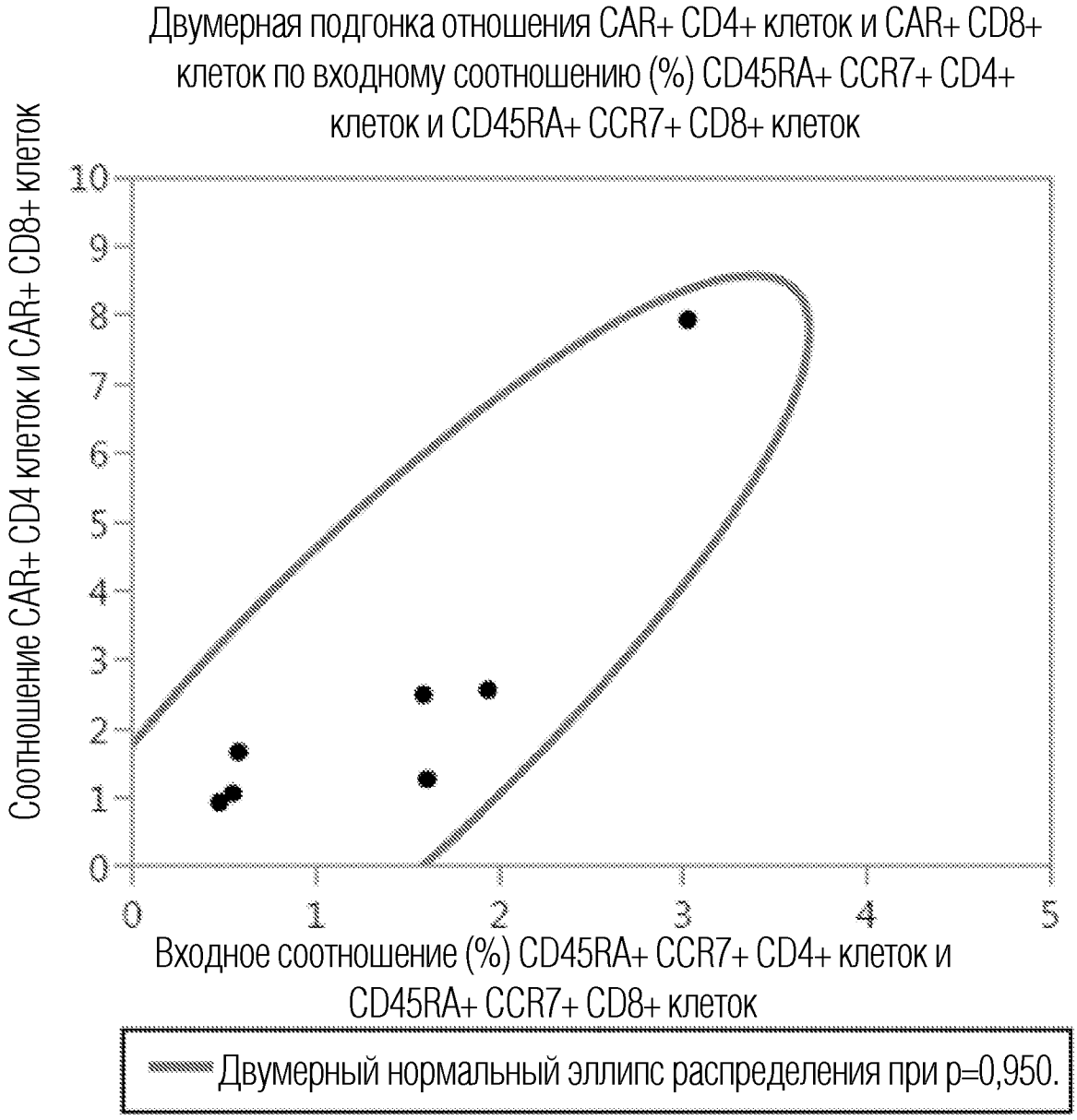
ФИГ. 2С


Соотношение CAR+ CD4 клеток и CAR+ CD8+ клеток
4
3.5
3
2.5
ВЕРХНИЙ ПРЕДЕЛ
1.5
ЦЕЛЕВОЕ ЗНАЧЕНИЕ
НИЖНИЙ ПРЕДЕЛ
0
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
Среднее соотношение (%) CD27+ CCR7+ CD4 клеток и CD27+ CCR7+ CD8 Т-клеток

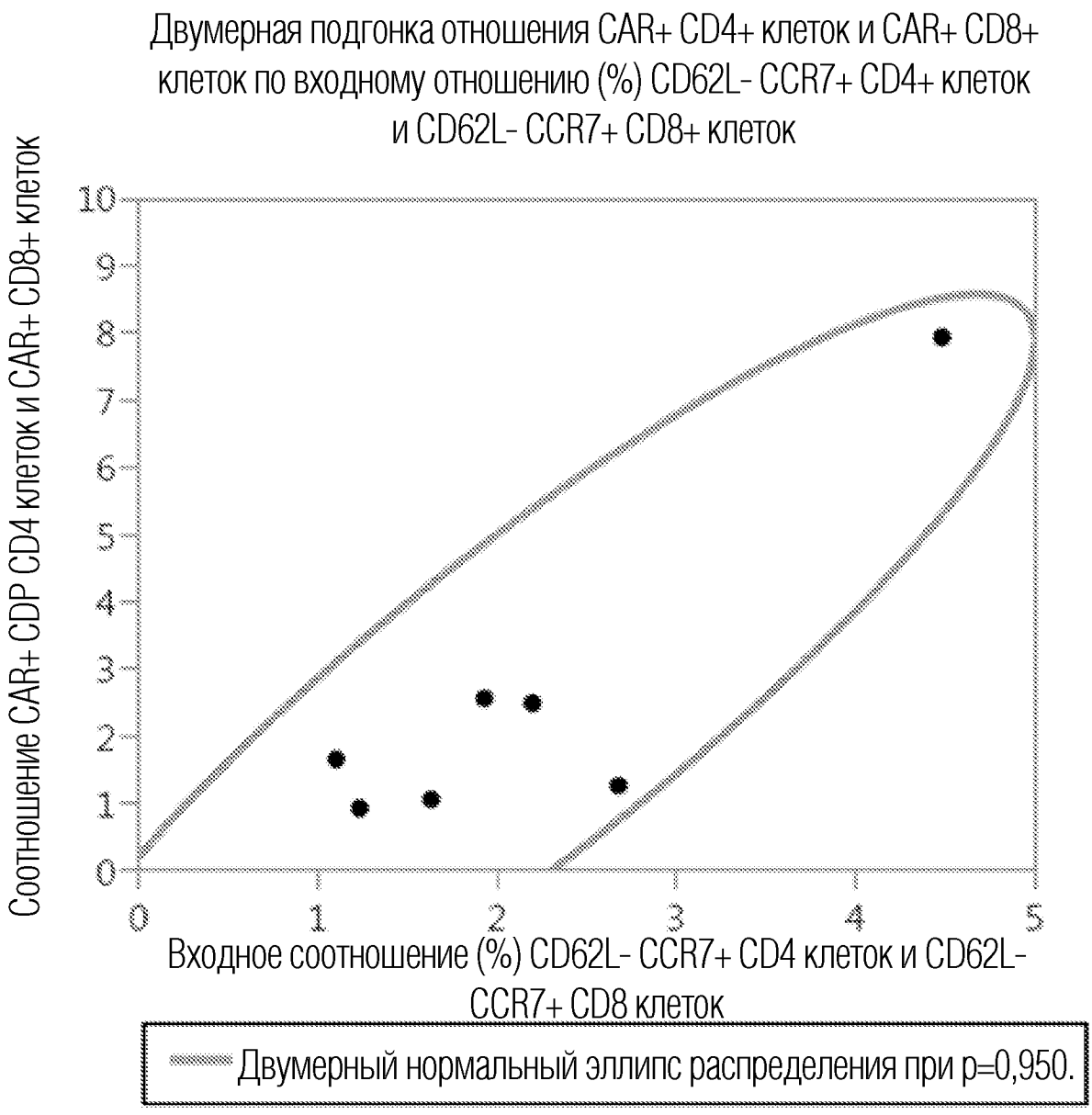
ФИГ. 3А


Двумерная подгонка отношения CAR+ CD4+ клеток и CAR+ CD8+ клеток по входному соотношению (%) CD27+ CCR7+ CD4+ клеток и CD27+ CCR7+ CD8+ клеток
Соотношение CAR+ CD4 клеток и CAR+ CD8+ клеток
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Входное соотношение (%) CD27+ CCR7+ CD4+ клеток и CD27+ CCR7+ CD8+ клеток
Двумерный нормальный эллипс распределения при p=0,950.

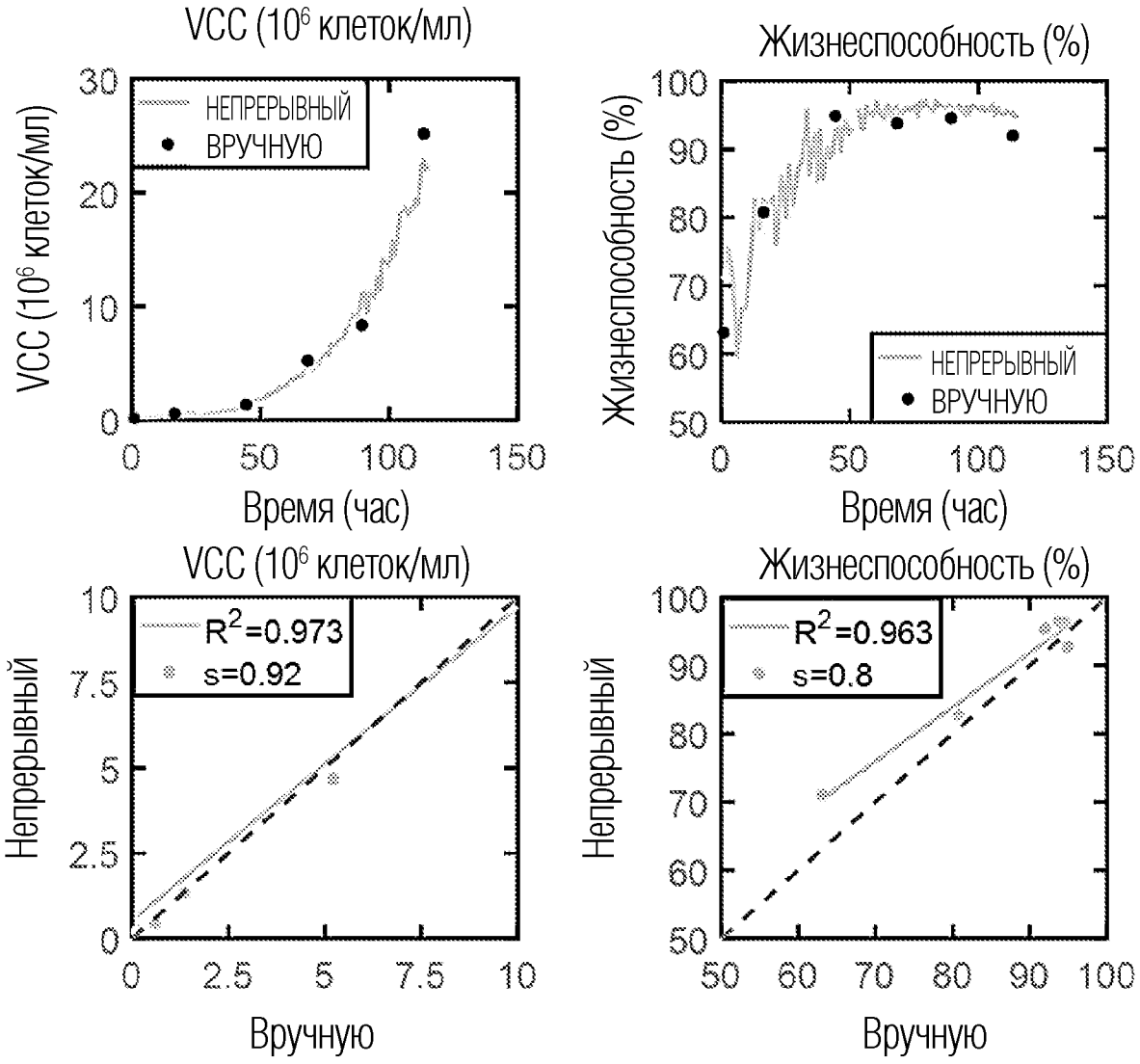
ФИГ. 3B


Двумерная подгонка отношения CAR+ CD4+ клеток и CAR+ CD8+ клеток по входному соотношению (%) CD45RA+ CCR7+ CD4+ клеток и CD45RA+ CCR7+ CD8+ клеток
Соотношение CAR+ CD4 клеток и CAR+ CD8+ клеток
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0
1
2
3
4
5
Входное соотношение (%) CD45RA+ CCR7+ CD4+ клеток и CD45RA+ CCR7+ CD8+ клеток
Двумерный нормальный эллипс распределения при p=0,950.

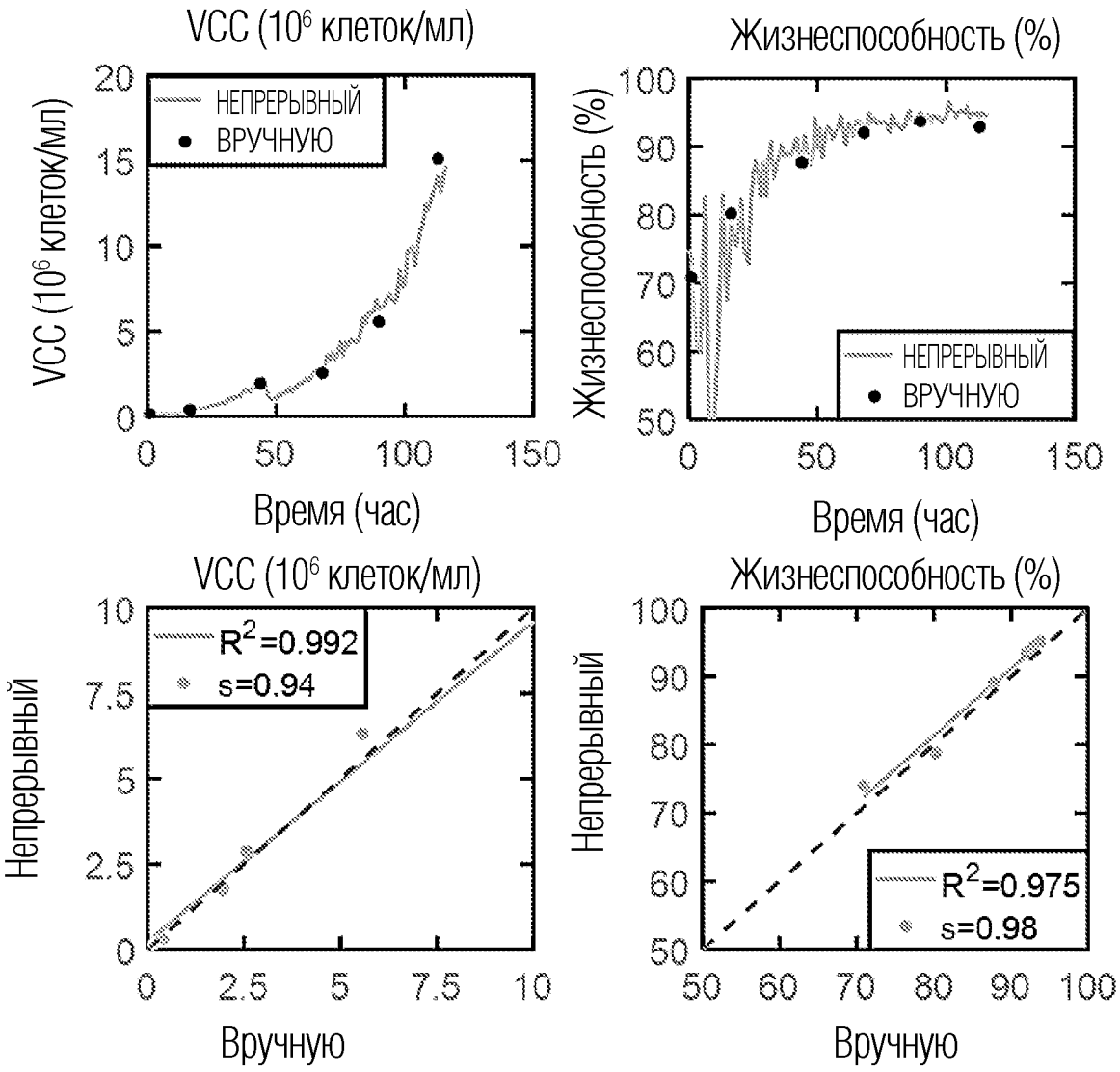
ФИГ. 3C


Двумерная подгонка отношения CAR+ CD4+ клеток и CAR+ CD8+ клеток по входному отношению (%) CD62L- CCR7+ CD4+ клеток и CD62L- CCR7+ CD8+ клеток
Соотношение CAR+ CDP CD4 клеток и CAR+ CD8+ клеток
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0
1
2
3
4
5
Входное соотношение (%) CD62L- CCR7+ CD4 клеток и CD62L- CCR7+ CD8 клеток
Двумерный нормальный эллипс распределения при p=0,950.

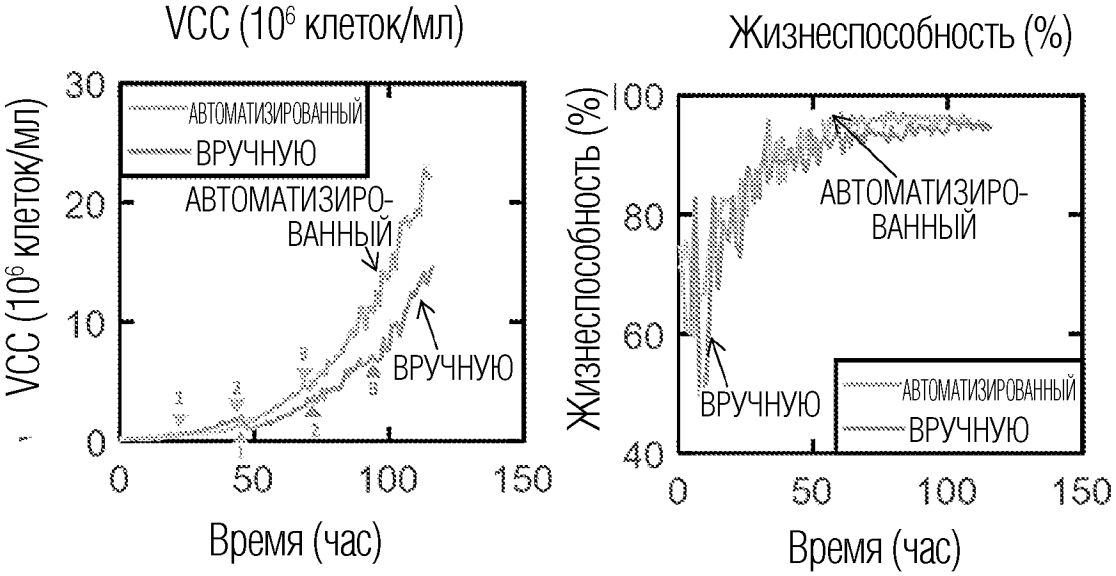
ФИГ. 4А


VCC (10^6 клеток/мл)
VCC (10^6 клеток/мл)
НЕПРЕРЫВНЫЙ
ВРУЧНУЮ
Время (час)
Жизнеспособность (%)
Жизнеспособность (%)
НЕПРЕРЫВНЫЙ
ВРУЧНУЮ
Время (час)
VCC (10^6 клеток/мл)
Непрерывный
R^2=0.973
s=0.92
Вручную
Жизнеспособность (%)
Непрерывный
R^2=0.963
s=0.8
Вручную

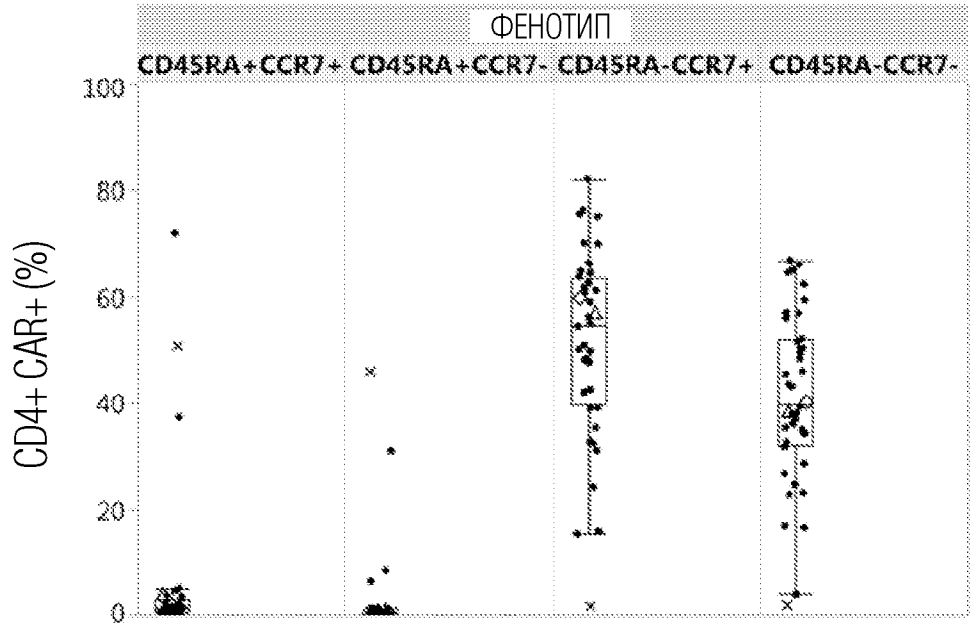
ФИГ. 4B


VCC (10^6 клеток/мл)
VCC (10^6 клеток/мл)
НЕПРЕРЫВНЫЙ
ВРУЧНУЮ
Время (час)
Жизнеспособность (%)
Жизнеспособность (%)
НЕПРЕРЫВНЫЙ
ВРУЧНУЮ
Время (час)
VCC (10^6 клеток/мл)
Непрерывный
R^2=0.992
s=0.94
Вручную
Жизнеспособность (%)
Непрерывный
R^2=0.975
s=0.98
Вручную

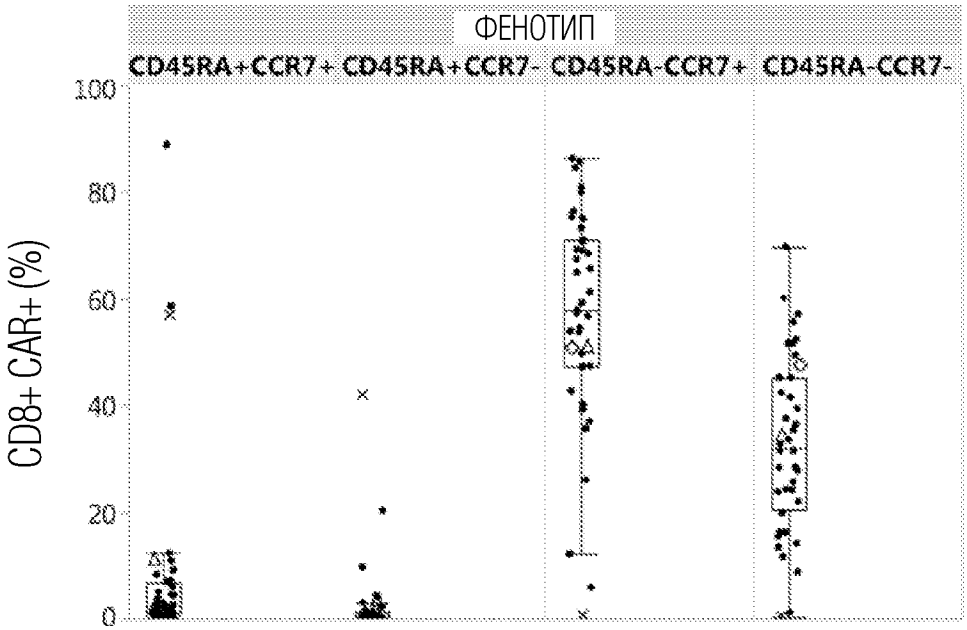
ФИГ. 5


VCC (10^6 клеток/мл)
VCC (10^6 клеток/мл)
АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ
ВРУЧНУЮ
АВТОМАТИЗИРО-
ВАННЫЙ
ВРУЧНУЮ
Время (час)
Жизнеспособность (%)
Жизнеспособность (%)
АВТОМАТИЗИРО-
ВАННЫЙ
ВРУЧНУЮ
АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ
ВРУЧНУЮ
Время (час)

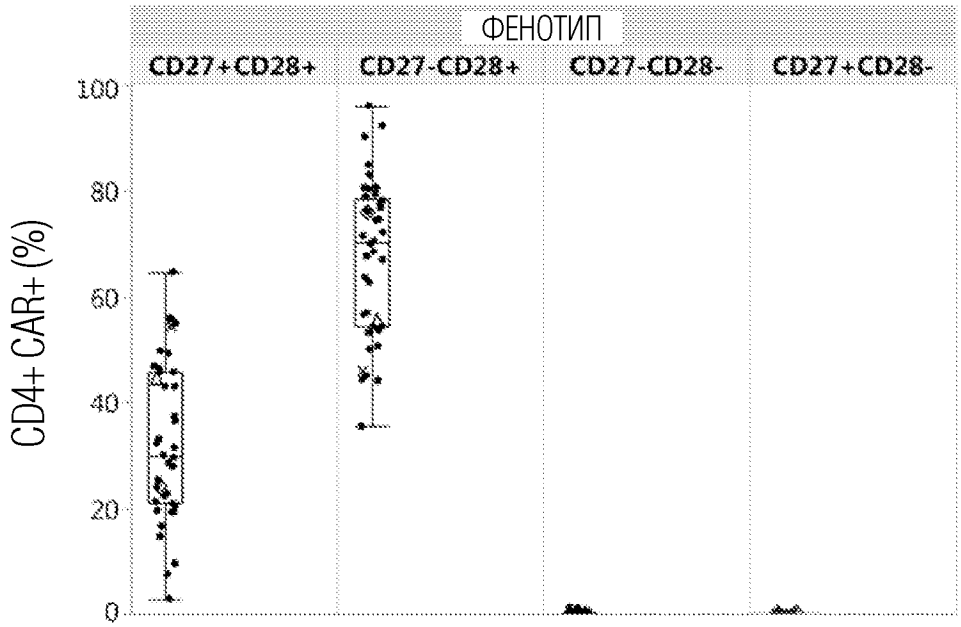
ФИГ. 6A


ФЕНОТИП
CD45RA+CCR7+
CD45RA+CCR7-
CD45RA-CCR7+
CD45RA-CCR7-
CD4+ CAR+ (%)
100
80
60
40
20
0

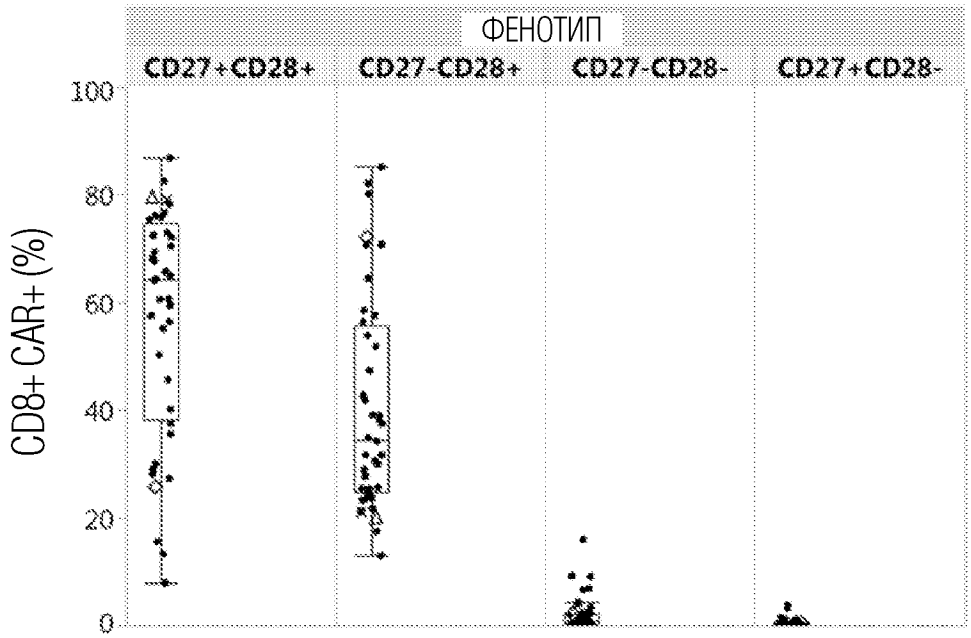
ФИГ. 6B


ФЕНОТИП
CD45RA+CCR7+
CD45RA+CCR7-
CD45RA-CCR7+
CD45RA-CCR7-
CD8+ CAR+ (%)
100
80
60
40
20
0

ФИГ. 6C


ФЕНОТИП
CD27+CD28+
CD27-CD28+
CD27-CD28-
CD27+CD28-
CD4+ CAR+ (%)
100
80
60
40
20
0

ФИГ. 6D


ФЕНОТИП
CD27+CD28+
CD27-CD28+
CD27-CD28-
CD27+CD28-
CD8+ CAR+ (%)
100
80
60
40
20
0