

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091409 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.08

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.07

(54) ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ И СВЯЗАННЫХ СПОСОБОВ

(31) 62/596,775; 62/643,165; 62/657,716;
62/716,967

(32) 2017.12.08; 2018.03.14; 2018.04.13;
2018.08.09

(33) US

(86) PCT/US2018/064630

(87) WO 2019/113559 2019.06.13

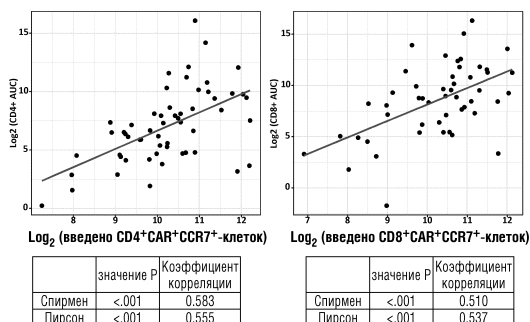
(88) 2019.07.18

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

(72) Изобретатель:
Ларсон Райан П., Рамсбург Кристофер
Глен, Сазерленд Клэр Л., Дейв
Кедар Химаншу, Йи Нейтан К., Йост
Рейчел К., Хаузе Рональд Джеймс, мл.,
Деврис Тодд (US)

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

(57) Представлены способы, композиции и промышленные изделия для применения в клеточной терапии, включающей введение одной или нескольких доз композиции терапевтических Т-клеток, и способы, композиции и промышленные изделия для применения в них. Клетки композиции Т-клеток экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как химерные рецепторы, например химерные антигенные рецепторы (CAR) или другие трансгенные рецепторы, такие как Т-клеточные рецепторы (TCR). Характеристики вариантов осуществления настоящего изобретения, включая дозу вводимых клеток или единиц клеток и/или фенотип вводимых клеток, обеспечивают различные преимущества, такие как стабильное дозирование, сниженный риск токсичности и/или повышенный ответ у индивидуумов, которым вводят композиции Т-клеток.



A1

202091409

202091409

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563448EA/032

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ И СВЯЗАННЫХ СПОСОБОВ

Перекрестные ссылки на родственные заявки

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительной заявки США № 62/596775, зарегистрированной 8 декабря 2017 года, озаглавленной "PHENOTYPIC MARKERS FOR CELL THERAPY AND RELATED METHODS", предварительной заявки США № 62/643165, зарегистрированной 14 марта 2018 года, озаглавленной "PHENOTYPIC MARKERS FOR CELL THERAPY AND RELATED METHODS", предварительной заявки США № 62/657716, зарегистрированной 13 апреля 2018 года, озаглавленной "PHENOTYPIC MARKERS FOR CELL THERAPY AND RELATED METHODS", и предварительной заявки США № 62/716967, зарегистрированной 9 августа 2018 года, озаглавленной "PHENOTYPIC MARKERS FOR CELL THERAPY AND RELATED METHODS", содержание которых полностью включено в качестве ссылки.

Включение в качестве ссылки списка последовательностей

[0002] Настоящая заявка подана вместе со списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей предоставлен в виде файла, названного 735042014540SeqList.txt, созданного 7 декабря 2018 года, размером 35461 байт. Информация из списка последовательностей в электронном формате полностью включена в качестве ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

[0003] Настоящее изобретение относится к клеточной терапии, включающей введение одной или нескольких доз композиции терапевтических Т-клеток, и к способам, композициям и промышленным изделиям для их применения. Клетки композиции Т-клеток экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как химерные рецепторы, например, химерные антигенные рецепторы (CAR) или другие трансгенные рецепторы, такие как Т-клеточные рецепторы (TCR). Характеристики вариантов осуществления настоящего изобретения, включая дозу или количество вводимых клеток, и/или фенотип вводимых клеток, обеспечивают различные преимущества, такие как стабильное дозирование, сниженный риск токсичности и/или увеличенный ответ у индивидуумов, которым вводят композиции Т-клеток.

Уровень техники, предшествующий изобретению

[0004] Для лечения заболеваний и патологических состояний доступны различные способы иммунотерапии и/или клеточной терапии. Например, способы терапии adoptивными клетками (включая способы, включающие введение клеток, экспрессирующие химерные рецепторы, специфичные для представляющего интерес заболевания или нарушения, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR) и/или другие рекомбинантные антигенные рецепторы, а также другие способы терапии

адоптивными клетками иммунной системы и адоптивными Т-клетками) могут являться эффективными при лечении злокачественных опухолей или других заболеваний или нарушений. Существует необходимость в улучшенных подходах. Предоставлены способы и промышленные изделия, которые удовлетворяют такие потребности.

Сущность изобретения

[0005] В настоящем документе предоставлены терапевтические композиции, содержащие Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 50% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 60% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 70% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 80% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности.

[0006] В определенных вариантах осуществления Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD8⁺ Т-клетки или состоят из них; Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD4⁺ Т-клетки или состоят из них; Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки или состоят из них; Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат по меньшей мере или приблизительно 30%, 50%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 100% CD8⁺ Т-клеток или состоят из них; Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат по меньшей мере или приблизительно 30%, 50%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 100% CD4⁺ Т-клеток или состоят из них; и/или Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат приблизительно 1:1 или приблизительно от 1:3 до 3:1 или приблизительно от 1:2 до 2:1 CD4⁺:CD8⁺ Т-клеток или состоят из них.

[0007] В настоящем документе предоставлены способы, композиции и промышленные изделия, включающие или содержащие стандартную дозу клеток, основанную на определенном количестве, например, Т-клеток подтипа $CD8^+$ или Т-клеток подтипа $CD4^+$ или этих клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или на отношении таких Т-клеток подтипов $CD8^+$ и $CD4^+$. В определенных вариантах осуществления все Т-клетки в композиции или все Т-клетки в композиции, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 на поверхности. В определенных вариантах осуществления все Т-клетки в композиции или все Т-клетки в композиции, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, позитивны по CD27 на поверхности. В определенных вариантах осуществления все Т-клетки в композиции или все Т-клетки в композиции, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и CD27 на поверхности. В определенных вариантах осуществления композиция содержит одну или несколько стандартных доз клеток.

[0008] В определенных вариантах осуществления определенный подтип клеток положителен по поверхностному клеточному маркеру, такому как маркер фенотипа центральных клеток памяти, и/или его поверхностный клеточный маркер представляет собой CCR7 и/или CD27. В определенных вариантах осуществления предоставляемые способы, композиции и промышленные изделия предназначены для применения в связи с клеточной терапией, такой как терапия подвергнутыми инженерии Т-клетками для лечения заболеваний и патологических состояний, включая различные опухоли.

[0009] В настоящем документе предоставлены промышленные изделия. В определенных вариантах осуществления предоставляемые промышленные изделия включают контейнер, содержащий одну или несколько стандартных доз клеток, находящиеся в одной или нескольких терапевтических композициях, где стандартная доза содержит множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих (необязательно подвергнутых инженерии так, чтобы экспрессировать) рекомбинантный рецептор, где стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют (необязательно экспрессируют на поверхности) рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и инструкции для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или нескольких ее стандартных доз и/или объема, соответствующего таким одной или нескольким стандартным дозам.

[0010] В настоящем документе предоставлены промышленные изделия. В определенных вариантах осуществления предоставляемые промышленные изделия

включают контейнер, содержащий одну или несколько стандартных доз клеток, находящиеся в одной или нескольких терапевтических композициях, где стандартная доза содержит множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих (необязательно подвергнутых инженерии так, чтобы экспрессировать) рекомбинантный рецептор, где стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют (необязательно экспрессируют на поверхности) рецептор кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/ $CD8^+$ / $CD27^+$ -клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/ $CD4^+$ / $CD27^+$ -клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ / $CD27^+$ -клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ / $CD27^+$ -клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ / $CD27^+$ -клеток и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ / $CD27^+$ -клеток и другого подмножества клеток в композиции; и инструкции для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или нескольких ее стандартных доз и/или объема, соответствующего таким одной или нескольким стандартным дозам.

[0011] Также в настоящем документе предоставлены терапевтические композиции. В определенных вариантах осуществления терапевтическая композиция содержит Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции (или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор), позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности, необязательно, где: Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат $CD8^+$ Т-клетки или состоят из них; Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат $CD4^+$ Т-клетки или состоят из них; Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки или состоят из них; Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат по меньшей мере или приблизительно 30%, 50%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 100% $CD8^+$ Т-клеток или состоят из них; Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат по меньшей мере или приблизительно 30%, 50%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 100% $CD4^+$ Т-клеток или состоят из них; Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат приблизительно 1:1 или приблизительно от 1:3 до 3:1 или приблизительно от 1:2 до 2:1 $CD4^+ : CD8^+$ Т-клеток или состоят из них.

[0012] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит любую из терапевтических композиций, описываемых в настоящем документе.

[0013] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD8^+ / CCR7^+$ -клеток и/или стандартная доза клеток

содержит определенное количество $CD4^+/CCR7^+$ -клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD8^+/CD27^+$ -клеток и/или стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD4^+/CD27^+$ -клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ -клеток и/или стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ -клеток.

[0014] В определенных вариантах осуществления стандартная доза или композиция всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 $CD8^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор $^+$ / $CD8^+$ -клетки), или $CD4^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор $^+$ / $CD4^+$ -клетки), рецептор $^+$ / $CD8^+/CCR7^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD4^+/CCR7^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+/CD27^+$ -клеток, каждое включительно, и/или стандартная доза или композиция всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор $^+$ / $CD8^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD8^+/CCR7^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD4^+/CCR7^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+/CD27^+$ -клеток.

[0015] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор $^+$ / $CD8^+/CCR7^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор $^+$ / $CD4^+/CCR7^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+/CD27^+$ -клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор $^+$ / $CD8^+/CCR7^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор $^+$ / $CD4^+/CCR7^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+/CD27^+$ -клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор $^+$ -клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор $^+$ -клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор $^+$ / $CD8^+/CCR7^+$ - или рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клетки; или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор $^+$ -клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%,

приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки.

[0016] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток или композиция содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

[0017] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток или композиция содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1. В определенных вариантах осуществления определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CCR7 и/или CD45RA на клетках. В определенных вариантах осуществления определенное количество клеток дополнительно экспрессирует или не экспрессирует CCR7 и/или CD45RA, необязательно, где определенное количество клеток дополнительно представляют собой CCR7⁺- или CD45RA⁻-клетки.

[0018] В определенных вариантах осуществления определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CD27 и/или CD45RA на клетках. В определенных вариантах осуществления определенное количество клеток дополнительно экспрессирует или не экспрессирует CD27 и/или CD45RA, необязательно, где определенное количество клеток дополнительно представляют собой CD27⁺- или CD45RA⁻-клетки. В определенных вариантах осуществления определенное количество дополнительно содержит клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют CD27 и/или CD45RA, необязательно, где определенное количество дополнительно содержит CD27⁺- или CD45RA⁻-клетки. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток или композиция содержит определенное количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток или композиция содержит определенное количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток.

[0019] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺ или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻.

[0020] Также в настоящем документе предоставлены промышленные изделия, которые включают: контейнер, содержащий одну или несколько стандартных доз клеток, находящихся в одной или нескольких терапевтических композициях, где стандартная доза содержит множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих, необязательно подвергнутых инженерии так, чтобы экспрессировать, рекомбинантный рецептор, где стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток, и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и инструкции для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или нескольких ее стандартных доз и/или объема, соответствующего таким одной или нескольким стандартным дозам. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 $CD8^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/ $CD8^+$ -клетки), или $CD4^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/ $CD4^+$ -клетки), рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/ $CD8^+$ -клеток или рецептор⁺/ $CD4^+$ -клеток, рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

[0021] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток, и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , или 1×10^7 рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или

приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки.

[0022] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

[0023] В определенных вариантах осуществления определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CD45RA на клетках. В определенных вариантах осуществления определенное количество клеток дополнительно экспрессирует или не экспрессирует CD45RA, необязательно, где определенное количество клеток дополнительно представляют собой CD45RA⁻-клетки. В определенных вариантах осуществления определенное количество дополнительно содержит клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют CD45RA, необязательно, где определенное количество дополнительно содержит CD45RA⁻-клетки.

[0024] В определенных вариантах осуществления во множестве промышленных изделий, или стандартных дозах, или композициях, необязательно получаемых тем же способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 (CCR7⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

[0025] В определенных вариантах осуществления стандартная доза или количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, всего содержат точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 , точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD3⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD3⁺-клетки), или CD3⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза или количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, содержат не более чем приблизительно 5×10^8 , не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем

приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD3⁺-клеток или CD3⁺-клеток.

[0026] В определенных вариантах осуществления общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые являются живыми или жизнеспособными. В определенных вариантах осуществления общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, и/или представляет собой общее количество таких клеток, которые негативны (-) по маркерам апоптоза, где маркеры апоптоза представляют собой аннексин V или активированную каспазу 3.

[0027] В определенных вариантах осуществления инструкции определяют введение множество стандартных доз, содержащихся во множестве отдельных композиций. В определенных вариантах осуществления множество отдельных композиций содержит первую композицию, содержащую одно из CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток, и вторую композицию, содержащую другое из CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления первая композиция содержит CD8⁺ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления первая композиция содержит CD4⁺ Т-клетки.

[0028] В определенных вариантах осуществления инструкции определяют введение композиции, содержащей CD8⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, и композиции, содержащей CD4⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа, не более 30 минут, не более 15 минут, не более чем 10 минут или не более чем 5 минут или одновременно.

[0029] В определенных вариантах осуществления инструкции определяют введение композиции, содержащей CD8⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, до

введения композиции, содержащей CD4⁺-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или нескольким стандартным дозам. В определенных вариантах осуществления инструкции определяют введение композиции, содержащей CD4⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, до введения композиции, содержащей CD8⁺-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или нескольким стандартным дозам.

[0030] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный антигенный рецептор. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который ассоциирован с клетками или тканями, вовлеченными в заболевание, нарушение или патологическое состояние, специфичен к ним и/или экспрессирован на них. В определенных вариантах осуществления заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль. В определенных вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

[0031] В определенных вариантах осуществления антиген-мишень выбран из интегрина $\alpha v \beta 6$ (интегрин $\alpha v \beta 6$), антигена созреваия В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раковотестикулярного антигена, антигена рака/семенников 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), раковозмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, хемокинового лиганда с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD138, CD171, белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогенов, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолата альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPCR5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора IL-22 альфа (IL-22Ra), рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, представителя А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антигена Льюиса Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, мезотелина, с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1),

MUC16, лигандов представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белка мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, специфического антигена предстательной железы, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG, также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белка опухоли Вильмаса 1 (WT-1), специфического для патогена антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

[0032] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не являющийся TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

[0033] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его фрагмент, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент. В определенных вариантах осуществления фрагмент содержит вариабельные области антитела, связанные гибким линкером. В определенных вариантах осуществления фрагмент содержит scFv.

[0034] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор содержит область внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации содержит домен внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции сигнала первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В определенных вариантах осуществления домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит домен внутриклеточной сигнализации цепи CD3, необязательно цепи CD3-зета (CD3 ζ) или его сигнальную часть.

[0035] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен. В определенных вариантах осуществления

костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальные части. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен расположен между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации.

[0036] В определенных вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, получаемые у индивидуума. В определенных вариантах осуществления Т-клетки являются аутологичными для индивидуума. В определенных вариантах осуществления Т-клетки являются аллогенными для индивидуума.

[0037] Также в настоящем документе предоставлены способы лечения. В определенных вариантах осуществления способы лечения включают введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием одной или нескольких стандартных доз любой терапевтической композиции, описываемой в настоящем документе, или терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так, чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, и/или объема, соответствующего таким стандартным дозам. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и/или в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 (CCR7⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

[0038] Также в настоящем документе предоставлены способы лечения. В определенных вариантах осуществления способы лечения включают введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием одной или нескольких стандартных доз терапевтической композиции, описываемой в настоящем документе, или терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так, чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, и/или объема, соответствующего таким стандартным дозам, необязательно, где: стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CD27

(рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и/или в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CD27 (CD27⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

[0039] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество CD4⁺/CD27⁺-клеток.

[0040] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CCR7⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество CD4⁺/CCR7⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток.

[0041] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-

клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки; или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки.

[0042] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

[0043] В определенных вариантах осуществления определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CD27 и/или CD45RA на клетках. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1. В определенных вариантах осуществления определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CCR7 и/или CD45RA на клетках. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки.

[0044] В определенных вариантах осуществления также предоставлены способы лечения, где способы включают введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием одной или нескольких стандартных доз любой из композиций, описываемых в настоящем документе.

[0045] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 (CCR7⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

[0046] Также в настоящем документе предоставлены способы лечения, где способы включают введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так, чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, и/или объема, соответствующего таким стандартным дозам. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 (CCR7⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

[0047] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или стандартная доза всего содержит CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах

осуществления стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

[0048] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки.

[0049] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

[0050] В определенных вариантах осуществления определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CD45RA на клетках. В определенных вариантах осуществления определенное количество или отношение дополнительно основано количестве CD45RA⁻-клеток. В определенных вариантах осуществления определенное количество клеток дополнительно экспрессирует или не экспрессирует CD45RA, необязательно, где определенное количество клеток дополнительно представляют собой CD45RA⁻-клетки.

[0051] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 , точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD3⁺-клеток, которые

экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD3⁺-клетки), или всех CD3⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 5×10^8 , не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD3⁺-клеток или всех CD3⁺-клеток.

[0052] В определенных вариантах осуществления общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые являются живыми или жизнеспособными. В определенных вариантах осуществления общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, и/или представляет собой общее количество таких клеток, которые негативны (-) по маркерам апоптоза, где маркеры апоптоза представляют собой аннексин V или активированную каспазу 3.

[0053] В определенных вариантах осуществления способ включает введение множества стандартных доз, содержащихся во множестве отдельных композиций.

[0054] В определенных вариантах осуществления множество отдельных композиций содержит первую композицию, содержащую одно из CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток, и вторую композицию, содержащую другое из CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления первая композиция содержит CD8⁺ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления первая композиция содержит CD4⁺ Т-клетки.

[0055] В определенных вариантах осуществления способ включает введение композиции, содержащей CD8⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, и композиции, содержащей CD4⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, с

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

[0056] В определенных вариантах осуществления способ включает введение композиции, содержащей CD8⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, до введения композиции, содержащей CD4⁺-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или несколькими стандартным дозам. В определенных вариантах осуществления способ включает введение композиции, содержащей CD4⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, до введения композиции, содержащей CD8⁺-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или несколькими стандартным дозам.

[0057] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный антигенный рецептор. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который ассоциирован с клетками или тканями, вовлеченными в заболевание, нарушение или патологическое состояние, специфичен к ним и/или экспрессирован на них. В определенных вариантах осуществления заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль. В определенных вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

[0058] В определенных вариантах осуществления антиген-мишень выбран из интегрина $\alpha\upsilon\beta 6$ (интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидраза 9 (CA9, также известного как CAIX или G250), раковотестикулярного антигена, антигена рака/семенников 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), раковоэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, хемокинового лиганда с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогенов, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолата альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора IL-22 альфа (IL-22Ra),

рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, представителя A семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антигена Льюиса Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, мезотелина, с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов представителя B группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белка мелана A (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, специфического антигена предстательной железы, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфичного для патогена антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

[0059] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не являющийся TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

[0060] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его фрагмент, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент. В определенных вариантах осуществления фрагмент содержит переменные области антитела, связанные гибким линкером. В определенных вариантах осуществления, где фрагмент содержит scFv.

[0061] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор содержит область внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации содержит домен внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции сигнала первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В определенных вариантах осуществления домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит домен внутриклеточной сигнализации цепи CD3, необязательно цепи CD3-зета (CD3 ζ) или его сигнальную часть.

[0062] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальные части. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен расположен между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации.

[0063] В определенных вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, получаемые у индивидуума. В определенных вариантах осуществления Т-клетки являются аутологичными для индивидуума. В определенных вариантах осуществления Т-клетки являются аллогенными для индивидуума.

[0064] Также в настоящем документе предоставлены способы определения единицы дозирования подвергнутых инженерии Т-клеток для лечения индивидуума. В определенных вариантах осуществления способ включает оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так, чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и CCR7 (рецептор⁺/CCR7⁺). В определенных вариантах осуществления способ, основываясь на количестве процентном содержании или отношении рецептор⁺/CCR7⁺-клеток, включает определение одной или несколько стандартных доз клеток для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

[0065] Также в настоящем документе предоставлены способы определения единицы дозирования подвергнутых инженерии Т-клеток для лечения индивидуума. В определенных вариантах осуществления способ включает (а) оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так, чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют

рекомбинантный рецептор и CD27 (рецептор⁺/CD27⁺); и (b) основываясь на количестве, процентном содержании или отношении рецептор⁺/CD27⁺-клеток, определение одной или несколько стандартных доз клеток для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

[0066] Также в настоящем документе предоставлены способы получения композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток. В определенных вариантах осуществления способ включает оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так, чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CCR7⁺/CD27⁺). В определенных вариантах осуществления способ включает заполнение контейнера всей или частью композиции и необязательно другим раствором с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции. В определенных вариантах осуществления способ включает заполнение контейнера всей или частью композиции и необязательно другим раствором с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

[0067] Также в настоящем документе предоставлены способы получения терапевтической композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток. В определенных вариантах осуществления способ включает заполнение контейнера всей

или частью композиции Т-клеток, где композиция Т-клеток содержит Т-клетки, несущие рекомбинантный рецептор, который специфически связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или патологическим состоянием, с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

[0068] Также в настоящем документе предоставлены способы получения терапевтической композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток. В определенных вариантах осуществления способ включает заполнение контейнера всей или частью композиции Т-клеток, где композиция Т-клеток содержит Т-клетки, несущие рекомбинантный рецептор, который специфически связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или патологическим состоянием, с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/ $CD4^+$ /CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ /CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

[0069] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток.

[0070] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 $CD8^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/ $CD8^+$ -клетки), или $CD4^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/ $CD4^+$ -клетки), рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-клеток или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем

приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток.

[0071] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки; или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки.

[0072] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

[0073] В определенных вариантах осуществления стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют CD27 и/или CD45, необязательно, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих CD27⁺- или CD45RA⁺-клетки.

[0074] В определенных вариантах осуществления способы дополнительно включают оценку в терапевтической композиции количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CD27 и/или

CD45RA, необязательно количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые представляют собой CD27⁺-клетки или CD45RA⁻-клетки.

[0075] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток.

[0076] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки.

[0077] Также в настоящем документе предоставлены способы определения стандартной дозы подвергнутых инженерии Т-клеток для лечения индивидуума. В определенных вариантах осуществления способ включает оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так, чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CCR7⁺/CD27⁺). В определенных вариантах осуществления способ, основываясь на количестве, процентном содержании или отношении рецептор⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, включает определение одной или несколько стандартных доз клеток для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

[0078] Также в настоящем документе предоставлены способы получения композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток. В определенных вариантах осуществления способ включает оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так, чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CCR7⁺/CD27⁺). В определенных вариантах осуществления способ включает заполнение контейнера всей или частью композиции и необязательно другим раствором с

получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор $^+$ / $CD8^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор $^+$ / $CD4^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клетки), и/или определенное отношение рецептор $^+$ / $CD8^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток и рецептор $^+$ / $CD4^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток и/или определенное отношение рецептор $^+$ / $CD8^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток и/или рецептор $^+$ / $CD4^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток и другого подмножества клеток в композиции.

[0079] Также в настоящем документе предоставлены способы получения терапевтической композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток. В определенных вариантах осуществления способ включает заполнение контейнера всей или частью композиции Т-клеток, где композиция Т-клеток содержит Т-клетки, несущие рекомбинантный рецептор, который специфически связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или патологическим состоянием, с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор $^+$ / $CD8^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор $^+$ / $CD4^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клетки), и/или определенное отношение рецептор $^+$ / $CD8^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток и рецептор $^+$ / $CD4^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток и/или определенное отношение рецептор $^+$ / $CD8^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток и/или рецептор $^+$ / $CD4^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток и другого подмножества клеток в композиции.

[0080] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD8^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD4^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток.

[0081] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 $CD8^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор $^+$ / $CD8^+$ -клетки), или $CD4^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор $^+$ / $CD4^+$ -клетки), рецептор $^+$ / $CD8^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор $^+$ / $CD8^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD8^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+$ /CCR7 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток.

[0082] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки.

[0083] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

[0084] В определенных вариантах осуществления стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют CD45, необязательно, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих CD45RA⁻-клетки. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает оценку в терапевтической композиции количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CD45RA, необязательно количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые представляют собой CD45RA⁻.

[0085] Также предоставлены способы получения композиции клеток, содержащей подвергнутые генетической инженерии клетки. В определенных вариантах осуществления способ включает получение из полученного у индивидуума биологического образца входящей композиции, содержащей требуемый процент CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемый процент CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA. В определенных вариантах осуществления способ включает внесение во входящую композицию полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор. В

определенных вариантах осуществления способ включает стимуляцию клеток во входящей композиции до, в течение и/или после указанного внесения, где стимуляция включает инкубацию клеток в присутствии одного или нескольких стимулирующих средств, где указанная стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток. В определенных вариантах осуществления способ позволяет получать выходящую композицию, содержащую определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

[0086] Также предоставлены способы получения композиции клеток, содержащей подвергнутые генетической инженерии клетки. В определенных вариантах осуществления способ включает внесение во входящую композицию полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, где входящая композиция содержит требуемый процент CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемый процент CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, получаемый из полученного у индивидуума биологического образца, и входящую композицию стимулируют до, в течение и/или после указанного внесения посредством инкубации клеток в присутствии одного или нескольких стимулирующих средств, где указанная стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток; и где способ позволяет получать выходящую композицию, содержащую определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

[0087] Также предоставлены способы получения композиции клеток, содержащей подвергнутые генетической инженерии клетки. В определенных вариантах осуществления способ включает выделение из получаемого у индивидуума биологического образца требуемого количества CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемого количества CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, таким образом, получая входящую композицию. В определенных вариантах осуществления способ включает внесение во входящую композицию полинуклеотида, кодирующего

рекомбинантный рецептор. В определенных вариантах осуществления способ включает стимуляцию клеток во входящей композиции до, в течение и/или после указанного внесения, где стимуляция включает инкубацию клеток в присутствии одного или нескольких стимулирующих средств, где указанная стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток. В определенных вариантах осуществления способ позволяет получать выходящую композицию, содержащую определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

[0088] Также предоставлены способы получения композиции клеток, содержащей подвергнутые генетической инженерии клетки. В определенных вариантах осуществления способ включает внесение во входящую композицию полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, где входящую композицию получают посредством выделения из получаемого у индивидуума биологического образца требуемого количества CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемого количества CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и входящую композицию стимулируют до, в течение и/или после указанного внесения посредством инкубации клеток в присутствии одного или нескольких стимулирующих средств, где указанная стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток; и где способ позволяет получать выходящую композицию, содержащую определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

[0089] В определенных вариантах осуществления входящая композиция содержит требуемый процент CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемый процент CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA.

[0090] В определенных вариантах осуществления входящая композиция содержит требуемый процент CD4⁺/CCR7⁺-, CD4⁺/CD27⁺-, CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-, CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-, CD8⁺/CCR7⁺-, CD8⁺/CD27⁺-, CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻- и/или CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток.

[0091] В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток; или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

[0092] В определенных вариантах осуществления способы также включают определение одной или несколько стандартных доз композиции- Т-клеток для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, где стандартная доза содержит всю или часть выходящей композиции, которая содержит: определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

[0093] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CCR7⁺-клеток, CD4⁺/CCR7⁺-клеток,

CD8⁺/CD27⁺-клеток, CD4⁺/CD27⁺-клеток, CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

[0094] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 , каждое включительно, рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

[0095] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺; и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

[0096] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток; и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, или стандартная доза всего содержит рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺, и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

[0097] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки; и/или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%,

70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки; и/или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки.

[0098] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1; и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1; и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

[0099] В определенных вариантах осуществления стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют CD45, необязательно, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих CD45RA⁻-клетки. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток.

[0100] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻- или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки.

[0101] В определенных вариантах осуществления способы дополнительно включают перед получением или выделением определение количества, количества на единицу объема, количества на единицу массы и/или процентного содержания CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA.

[0102] В определенных вариантах осуществления одно или несколько стимулирующих средств способно к активации Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток и/или $CD8^+$ Т-клеток; способно к индукции сигнала через комплекс TCR и/или способно к индукции пролиферации Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток и/или $CD8^+$ Т-клеток.

[0103] В определенных вариантах осуществления одно или несколько стимулирующих средств содержит первичное средство, которое связывается с участником комплекса TCR, необязательно, которое специфически связывается с CD3. В определенных вариантах осуществления одно или несколько стимулирующих средств дополнительно содержат вторичное средство, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой Т-клетки. В определенных вариантах осуществления костимулирующая молекула выбрана из группы, состоящей из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. В определенных вариантах осуществления первичное и вторичное средства содержат антитела, необязательно, где одно или несколько стимулирующих средств включают инкубацию с антителом к CD3 и антителом к CD28. В определенных вариантах осуществления одно или несколько стимулирующих средств находятся на поверхности твердой подложки, необязательно гранулы. В определенных вариантах осуществления одно или несколько стимулирующих средств выбраны из группы, состоящей из связывающих CD3 молекул; связывающих CD28 молекул; рекомбинантного IL-2; рекомбинантного IL-15 и рекомбинантного IL-7, вакцины, содержащей антиген, специфически распознаваемый антигенным рецептором, и антиидиотипического антитела, которое специфически связывается с антигенным рецептором или их сочетаний.

[0104] В определенных вариантах осуществления терапевтическая композиция представляет собой любую из композиций, описываемых в настоящем документе.

[0105] В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или нескольких ее стандартных доз и/или объема, соответствующего таким одной или несколькими стандартным дозам.

[0106] В определенных вариантах осуществления в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 ($CCR7^+$ -клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

[0107] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 , точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 $CD3^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор $^+$ / $CD3^+$ -клетки), или всех $CD3^+$ -клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 5×10^8 , не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более

чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD3⁺-клеток или всех CD3⁺-клеток.

[0108] В определенных вариантах осуществления общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые являются живыми или жизнеспособными. В определенных вариантах осуществления общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, и/или представляет собой общее количество таких клеток, которые негативны (-) по маркерам апоптоза, где маркеры апоптоза представляют собой аннексин V или активированную каспазу 3.

[0109] В определенных вариантах осуществления способ включает введение множества стандартных доз, содержащихся во множестве отдельных композиций.

[0110] В определенных вариантах осуществления множество отдельных композиций содержит первую композицию, содержащую одно из CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток, и вторую композицию, содержащую другое из CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления первая композиция содержит CD8⁺ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления первая композиция содержит CD4⁺ Т-клетки.

[0111] В определенных вариантах осуществления способ включает введение композиции, содержащей CD8⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, и композиции, содержащей CD4⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа, не более 30 минут, не более 15 минут, не более 10 минут или не более 5 минут или одновременно.

[0112] В определенных вариантах осуществления способ включает введение композиции, содержащей CD8⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, до

введения композиции, содержащей CD4⁺-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или нескольким стандартным дозам. В определенных вариантах осуществления способ включает введение композиции, содержащей CD4⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, до введения композиции, содержащей CD8⁺-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или нескольким стандартным дозам.

[0113] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный антигенный рецептор. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который ассоциирован с клетками или тканями, вовлеченными в заболевание, нарушение или патологическое состояние, специфичен к ним и/или экспрессирован на них. В определенных вариантах осуществления заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль. В определенных вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

[0114] В определенных вариантах осуществления антиген-мишень выбран из интегрина $\alpha v \beta 6$ (интегрин $\alpha v \beta 6$), антигена созреваия В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидраза 9 (CA9, также известного как CAIX или G250), раковотестикулярного антигена, антигена рака/семенников 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), раковозмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, хемокинового лиганда с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогенов, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолата альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора IL-22 альфа (IL-22Ra), рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, представителя А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антигена Льюиса Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, мезотелина, с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1),

MUC16, лигандов представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белка мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, специфического антигена предстательной железы, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белка опухоли Вильмаса 1 (WT-1), специфичного для патогена антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

[0115] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не являющийся TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его фрагмент, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент. В определенных вариантах осуществления фрагмент содержит переменные области антитела, связанные гибким линкером. В определенных вариантах осуществления фрагмент содержит scFv.

[0116] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор содержит область внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации содержит домен внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции сигнала первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В определенных вариантах осуществления домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит домен внутриклеточной сигнализации цепи CD3, необязательно цепи CD3-зета (CD3 ζ) или его сигнальную часть.

[0117] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации.

[0118] В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит

домен внутриклеточной сигнализации костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальные части. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен расположен между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации.

[0119] В определенных вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, получаемые у индивидуума. В определенных вариантах осуществления Т-клетки являются аутологичными для индивидуума. В определенных вариантах осуществления Т-клетки являются аллогенными для индивидуума.

[0120] В определенных аспектах по любому из вариантов осуществления, предоставленному по настоящему документу, клетки в предоставляемой терапевтической композиции или стандартной дозе ассоциированы с определенными функциональными признаками, включая определенные виды зависимой от рекомбинантного рецептора (например, CAR) активности, которые зависят от активности или присутствия рекомбинантного рецептора, например, активности, индуцируемой или опосредуемой в присутствии антигена, распознаваемого рекомбинантным рецептором. В определенных вариантах осуществления функциональный признак включает продукцию высоких уровней цитокина, например, IL-2. В определенных аспектах по любому из вариантов осуществления, предоставленному по настоящему документу, функциональный признак включает продукция низких уровней цитокина, например, IFN γ или IL-13. В определенных вариантах осуществления высокие и низкие уровни таких цитокинов определяют относительно эталонной композиции, в которой содержится неопределенное количество клеток конкретного фенотипа и/или в которой клетки конкретного фенотипа не находятся в конкретном определенном отношении по вариантам осуществления, предоставляемым по настоящему документу. В определенных вариантах осуществления эталонная композиция представляет собой эталонную композицию, в которой содержится большая частота или количество Т-клеток с эффекторным или дифференцированным фенотипом.

[0121] В определенных аспектах при введении терапевтической композиции или стандартной дозы одному из группы индивидуумов по любому из вариантов осуществления, предоставляемых по настоящему документу, множество индивидуумов из группы индивидуумов демонстрирует один или несколько признаков ассоциированных с увеличенной эффективностью, продолжительностью и/или сниженной токсичностью после введение. В определенных вариантах осуществления множество индивидуумов из группы индивидуумов с большой вероятностью демонстрирует и/или ассоциировано с определенными фармакокинетическими параметрами, сниженной вероятностью развития токсичности или побочного эффекта и/или с конкретным ответом, эффективностью или исходом в виде увеличения продолжительности жизни. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой индивидуума с подозрением на наличие

заболевания или патологического состояния. В определенных вариантах осуществления один или несколько признаков улучшены по сравнению со сходной группой индивидуумов, обрабатываемых эталонной композицией, в которой содержится неопределенное количество клеток конкретного фенотипа и/или в которой клетки конкретного фенотипа не находятся в конкретном определенном отношении по вариантам осуществления, предоставляемым по настоящему документу. В определенных вариантах осуществления эталонная композиция представляет собой эталонную композицию, в которой содержится большая частота или количество Т-клеток с эффекторным или дифференцированным фенотипом.

[0122] В определенных аспектах при введении терапевтической композиции или стандартной дозы одному из группы индивидуумов по любому из вариантов осуществления, предоставляемых по настоящему документу, множество индивидуумов из группы индивидуумов с большой вероятностью демонстрирует и/или ассоциировано с конкретными фармакокинетическими параметрами, такими как максимальная (пиковая) концентрация в плазме (C_{max}), пиковое время (т.е., когда достигается максимальная концентрация в плазме (C_{max}); T_{max}), минимальная концентрация в плазме (т.е., минимальная концентрация в плазме между дозами терапевтического средства, например, CAR^+ Т-клеток; C_{min}), период полувыведения ($T_{1/2}$) и площадь под кривой (т.е., площадь под кривой получаем посредством построения графика зависимости времени и концентрации в плазме терапевтического средства CAR^+ Т-клеток; AUC). В определенных аспектах при введении терапевтической композиции или стандартной дозы множество индивидуумов в группе с большой вероятностью демонстрирует или ассоциировано с увеличенной максимальной (пиковой) концентрацией в плазме (C_{max}) вводимых клеток. В определенных вариантах осуществления у множества индивидуумов в группе наблюдают длительное присутствие клеток терапевтической композиции или стандартной дозы.

[0123] В определенных аспектах при введении терапевтической композиции или стандартной дозы одному из группы индивидуумов по любому из вариантов осуществления, предоставляемых по настоящему документу, множество индивидуумов из группы индивидуумов с большой вероятностью демонстрирует и/или ассоциировано со сниженной вероятностью развития токсичности или побочного эффекта, таких как синдром высвобождения цитокинов (CRS) или тяжелый CRS (sCRS) или нейротоксичность (NT) или тяжелая NT (sNT).

[0124] В определенных аспектах при введении терапевтической композиции или стандартной дозы одному из группы индивидуумов по любому из вариантов осуществления, предоставляемых по настоящему документу, множество индивидуумов из группы индивидуумов с большой вероятностью демонстрирует и/или ассоциировано с конкретным ответом, эффективностью или исходом в виде увеличения продолжительности жизни, такими как частичный ответ (PR) или частичная ремиссия, полный ответ (CR) или полная ремиссия, продолжительность жизни без прогрессирования (PFS), объективный ответ (OR), общая продолжительность жизни (OS), бессобытийная

продолжительность жизни (EFS), увеличенная длительность ответа (DOR) или увеличенный коэффициент выживаемости. В определенных аспектах при введении терапевтической композиции или стандартной дозы множество индивидуумов в группе с большой вероятностью демонстрирует или ассоциировано с увеличенной продолжительностью жизни без прогрессирования (PFS).

[0125] В определенных вариантах осуществления любого из предоставляемых вариантов осуществления способы, и/или применения, и/или введение стандартной дозы клеток на основе промышленных изделий, позволяют достигать определенных исходов и/или ассоциированы с определенными сниженными рисками токсичности, например, в группе индивидуумов, обрабатываемых способами или в соответствии с информацией, предоставляемой в промышленном изделии. В определенных аспектах, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 60%, индивидуумов, обработанных данным способом, достигают полного ответа (CR) или полной ремиссии, продолжительности жизни без прогрессирования (PFS), объективного ответа (OR), общей продолжительности жизни (OS), бессобытийной продолжительности жизни (EFS) или ответа, длящихся более 3 месяцев, более 6 месяцев или более 12 месяцев. В определенных вариантах осуществления любых предоставляемых способов, более чем или более чем приблизительно 50% индивидуумов, обработанных данным способом, не демонстрируют синдрома высвобождения цитокинов (CRS) 3 или большей степени или нейротоксичности 3 или большей степени. В определенных вариантах осуществления такие индивидуумы не демонстрируют CRS и/или нейротоксичности с ранним началом, например, не демонстрируют начало CRS ранее 3 суток после начала введения и/или не демонстрируют начала нейротоксичности ранее 5 суток после начала введения. В определенных вариантах осуществления любых предоставляемых способов более чем или более чем приблизительно 30%, 35%, 40% или 50% индивидуумов, обработанных данным способом, не демонстрируют никакой степени синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичности.

[0126] Также предоставлены выходящие композиции, получаемые любым из способов, описываемых в настоящем документе.

[0127] Также предоставлены стандартные дозы определяемые или получаемые любым из способов, описываемых в настоящем документе.

[0128] Также предоставлены фармацевтические композиции, содержащие любую из стандартных доз, описываемых в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции также включают фармацевтический носитель.

[0129] Также предоставлены способы лечения, включающие введение млекопитающему всей или части любой из выходящих композиций, стандартных доз или фармацевтических композиций, описываемых в настоящем документе.

[0130] Также предоставлены применения всей или части любой из выходящих композиций, стандартных доз или фармацевтических композиций, описываемых в настоящем документе, для лечения злокачественной опухоли.

[0131] Также предоставлены применения всей или части любой из выходящих композиций, стандартных доз или фармацевтических композиций, описываемых в настоящем документе, в производстве лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли.

[0132] Также предоставлены всей или части любой из выходящих композиций, стандартных доз или фармацевтических композиций, описываемых в настоящем документе, для применения в лечении злокачественной опухоли.

[0133] В настоящем документе предоставлены композиции терапевтических клеток, содержащие Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, который связывается с антигеном, где после стимуляции стимулирующим средством: по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, способны к продукции цитокина, выбранного из интерлейкина 2 (IL-2) и/или TNF-альфа; и/или по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных, из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, способны к продукции цитокина, выбранного из интерлейкина 2 (IL-2) и/или TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных, из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции цитокинов интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа.

[0134] В определенных вариантах осуществления стимулирующее средство представляет собой неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство. В определенных вариантах осуществления неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство представляет собой

поликлональное стимулирующее средство. В определенных вариантах осуществления неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее средство содержит РМА/иономицин, связывающее CD3 средство/связывающее CD28 средство, фитогемагглютинин (PHA) или конканавалин А (ConA). В определенных вариантах осуществления неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство содержит РМА/иономицин. В определенных вариантах осуществления стимулирующее средство специфически связывает рекомбинантный рецептор, необязательно, где стимулирующее средство представляет собой специфичный к антигену стимулирующий реагент и/или содержит антиген или его часть, специфически распознаваемые рекомбинантным рецептором. В определенных вариантах осуществления продукцию цитокинов определяют посредством анализа внутриклеточных цитокинов.

[0135] В определенных вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности, необязательно дополнительно негативны по экспрессии CD45RA на поверхности.

[0136] В определенных вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные клетки, получаемые у индивидуума. В определенных вариантах осуществления у индивидуума диагностирована злокачественная опухоль, необязательно, где злокачественная опухоль представляет собой лейкоз или лимфому. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой индивидуума, у которого на момент получения клеток, идентифицирована высокая опухолевая нагрузка или известно о ее наличии. В определенных вариантах осуществления у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если а сумма продуктивных размеров (SPD) опухоли у индивидуума точно или приблизительно превышает 30 см², 40 см², 50 см², 60 см² или 70 см²; и/или у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если содержание С-реактивного белка (CRP) в биологическом образце, необязательно образце сыворотки, полученной у индивидуума, точно или приблизительно превышает 5 миллиграмм на литр, 10 миллиграмм на литр, 15 миллиграмм на литр, 20 миллиграмм на литр, 25 миллиграмм на литр, 30 миллиграмм на литр, 40 миллиграмм на литр или 50 миллиграмм на литр. В определенных вариантах осуществления у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если SPD опухоли у индивидуума точно или приблизительно превышает 50 см². В определенных вариантах осуществления у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если содержание CRP в биологическом образце точно или приблизительно превышает 20 миллиграмм на литр.

[0137] В определенных вариантах осуществления терапевтическая композиция клеток обогащена CD4⁺ Т-клетками и/или по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по

меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 97% всех рекомбинантных рецептор⁺-клеток в композиции с подвергнутыми инженерии составляющими, или приблизительно от 60% до 99%, приблизительно от 75% до 99%, приблизительно от 85% до 99% или приблизительно от 90% до 99%, каждое включительно, всех клеток в композиции представляют собой CD4⁺-клетки. В определенных вариантах осуществления терапевтическая композиция клеток обогащена CD3⁺ Т-клетками, обогащена CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками и/или по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 97% всех рекомбинантных рецептор⁺-клеток в композиции с подвергнутыми инженерии составляющими, или приблизительно от 60% до 99%, приблизительно от 75% до 99%, приблизительно от 85% до 99% или приблизительно от 90% до 99%, каждое включительно, всех клеток в композиции представляют собой CD3⁺- или CD4⁺- и CD8⁺-клетки. В определенных вариантах осуществления терапевтическая композиция клеток содержит CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки с отношением CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, которое приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1, необязательно приблизительно от 1:2 до 2:1.

[0138] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный антигенный рецептор. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который ассоциирован с клетками или тканями, вовлеченными в заболевание, нарушение или патологическое состояние, специфичен к ним и/или экспрессирован на них. В определенных вариантах осуществления заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль. В определенных вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген. В определенных вариантах осуществления антиген-мишень выбран из интегрина $\alpha\text{v}\beta 6$ (интегрин $\alpha\text{v}\beta 6$), антигена созреваания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидраза 9 (CA9, также известного как CAIX или G250), раковотестикулярного антигена, антигена рака/семенников 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), раковоэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, хемокинового лиганда с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфатпротеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогенов, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолата альфа, ганглиозида GD2, О-

ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора IL-22 альфа (IL-22R α), рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13R α 2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, представителя А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антигена Льюиса Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белка мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, специфического антигена предстательной железы, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), связанного с тирозинкиназой белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), связанного с тирозинкиназой белка 2 (TRP2, также известного как дофахромтауомераз, дофахром-дельта-изомераз или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белка опухоли Вильмаса 1 (WT-1), специфичного для патогена или экспрессируемого на патогене антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

[0139] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не являющийся TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и область внутриклеточной сигнализации, содержащую домен внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его фрагмент, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент. В определенных вариантах осуществления фрагмент содержит вариабельные области антитела, связанные гибким линкером. В определенных вариантах осуществления фрагмент содержит scFv. В определенных вариантах осуществления домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции сигнала

первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В определенных вариантах осуществления домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит домен внутриклеточной сигнализации цепи CD3, необязательно цепи CD3-зета (CD3 ζ) или ее сигнальной части. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальные части. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен расположен между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации.

[0140] В определенных вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, получаемые у индивидуума. В определенных вариантах осуществления Т-клетки являются аутологичными для индивидуума.

[0141] В настоящем документе предоставлены промышленные изделия, содержащие контейнер, содержащий терапевтическую композицию клеток, описываемую в настоящем документе, и инструкции для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, терапевтическую композицию клеток, необязательно одну или несколько ее стандартных доз и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам. В определенных вариантах осуществления инструкции определяют введение множества стандартных доз, содержащихся во множестве отдельных композиций. В определенных вариантах осуществления множество отдельных композиций содержит первую композицию, содержащую терапевтическую композицию клеток, содержащую одно из CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток, и вторую композицию, содержащую другое из CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток, где указанная вторая композиция, содержит клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор или рекомбинантный рецептор, специфичный к антигену или к клеткам, экспрессируемым при заболевании или патологическом состоянии, необязательно, где вторая композиция представляет собой любую композицию, описываемую в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления инструкции определяют введение композиции, содержащей CD8⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, и композиции, содержащей CD4⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам в пределах интервала не более 48 часов, в пределах интервала не более 36 часов, в пределах интервала не более 24 часов, в

пределах интервала не более 12 часов, в пределах интервала не более 6 часов, в пределах интервала не более 2 часов, в пределах интервала не более 1 часа или одновременно. В определенных вариантах осуществления инструкции определяют введение композиции, содержащей $CD8^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, до введения композиции, содержащей $CD4^+$ -клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или нескольким стандартным дозам.

[0142] В настоящем документе предоставлены способы лечения, где способ включает введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием одной или нескольких стандартных доз терапевтической композиции клеток, описываемой в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления терапевтическая композиция представляет собой первую терапевтическую композицию клеток, содержащую одно из $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток и одна или несколько единиц дозирования дополнительно содержат вторую терапевтическую композицию клеток, содержащую другое из $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ -клеток, где указанная вторая композиция, содержит клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор или рекомбинантный рецептор, специфичный к антигену или к клеткам, экспрессируемым при заболевании или патологическом состоянии, необязательно, где вторая композиция представляет собой любую композицию, описываемую в настоящем документе.

[0143] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток во второй терапевтической композиции клеток или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности, необязательно дополнительно негативны по экспрессии CD45RA на поверхности. В определенных вариантах осуществления вторая терапевтическая композиция клеток обогащена $CD8^+$ Т-клетками и/или по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 97% всех рекомбинантный рецептор⁺-клеток в композиции с подвергнутыми инженерии составляющими, или приблизительно от 60% до 99%, приблизительно от 75% до 99%, приблизительно от 85% до 99% или приблизительно от 90% до 99%, каждое включительно, всех клеток в композиции представляют собой $CD8^+$ -клетки

[0144] В определенных вариантах осуществления первую терапевтическую композицию и вторую терапевтическую композицию вводят в пределах точно или приблизительно 48 часов, в пределах точно или приблизительно 36 часов, в пределах точно или приблизительно 24 часов, в пределах точно или приблизительно 12 часов, в пределах точно или приблизительно 6 часов, в пределах точно или приблизительно 2 часов или в пределах точно или приблизительно 1 часа друг от друга. В определенных

вариантах осуществления вторую терапевтическую композицию клеток, содержащую CD8⁺ Т-клетки, вводят перед первой композицией, содержащей CD4⁺ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления одна или несколько стандартных доз клеток содержит определенное отношение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, где это отношение составляет или приблизительно составляет 1:3 и приблизительно 3:1, необязательно, оно составляет или приблизительно составляет 1:2 и 2:1, необязательно, оно составляет или приблизительно составляет 1:1.

[0145] В настоящем документе предоставлены способы лечения индивидуума, где способ включает (А) оценку композиции с подвергнутыми инженерии клетками, содержащей Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор на признак, указывающий на функцию или фенотип подвергнутых инженерии клеток в композиции, где признак выбран из (i) процентного содержания Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности, и необязательно негативны по CD45RA на поверхности; и/или (ii) процентного содержания CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые способны к продукции IL-2, TNF-альфа и/или IFN-гамма после стимуляции стимулирующим средством; и (В) введение индивидууму с заболеванием или патологическим терапевтическим средством, где введение выбрано из: (1) если признак, указывающий на функцию или фенотип клеток композиции с подвергнутыми инженерии Т-клетками, находится на пороговом значении или превышает его, введения индивидууму одной или нескольких стандартных доз клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками, содержащей Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор; или (2) если признак, указывающий на функцию или фенотип клеток композиции с подвергнутыми инженерии Т-клетками, находится ниже порогового значения признака, введение терапевтического средства, выбранного из (а) одной или нескольких стандартных доз клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками и средства, способного усилить рост, пролиферацию или эффективность Т-клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками у индивидуума, (b) увеличенной дозы клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками, необязательно увеличенной по сравнению с одной или несколькими стандартными дозами, вводимыми индивидууму в тех же условиях с тем же заболеванием или патологическим состоянием, но демонстрирующему пороговое значение признака или более; или (с) альтернативного терапевтического средства для лечения заболевания или патологического состояния, отличного от одной или нескольких стандартных доз композиции с подвергнутыми инженерии клетками, где пороговое значение признака выбрано из (i) точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности; и/или (ii) точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих

рекомбинантный рецептор, способны к продукции интерлейкина 2 (IL-2) или TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством; и/или (iii) точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных, из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством.

[0146] В настоящем документе предоставлены способы лечения индивидуума, где способы включают введение индивидууму с заболеванием или патологическим терапевтическим средством, где введение выбрано из: (1) если признак, указывающий на функцию или фенотип клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками, содержащей Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, находится на пороговом значении или превышает его, введения индивидууму одной или нескольких стандартных доз клеток композиции с подвергнутыми инженерии Т-клетками; или (2) если признак, указывающий на функцию или фенотип клеток композиции с подвергнутыми инженерии Т-клетками, находится ниже порогового значения признака, введение терапевтического средства, выбранного из (a) одной или нескольких стандартных доз клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками и средства, способного усилить рост, пролиферацию или эффективность Т-клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками у индивидуума, (b) увеличенной дозы клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками, необязательно увеличенной по сравнению с одной или несколькими стандартными дозами, вводимыми индивидууму в тех же условиях с тем же заболеванием или патологическим состоянием, но демонстрирующему пороговое значение признака или более; или (c) альтернативного терапевтического средства для лечения заболевания или патологического состояния, отличного от дозы композиции с подвергнутыми инженерии клетками, где пороговое значение признака выбрано из (i) точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности; и/или (ii) точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, способны к продукции интерлейкина 2 (IL-2) или TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством; и/или (iii) точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных, из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством.

[0147] В определенных вариантах осуществления клетки композиции клеток являются аутологичными для индивидуума. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% или по меньшей мере 75% индивидуумов, обработанных данным способом, достигают продолжительности жизни без прогрессирования в течение по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев после введения одной или нескольких стандартных доз. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере у 35%, по меньшей мере у 40%, по меньшей мере у 50%, по меньшей мере у 60% или по меньшей мере у 70% или по меньшей мере у 75% индивидуумов, обработанных данным способом, не происходит прогрессирования заболевания в течение по меньшей мере или приблизительно 3 месяцев, по меньшей мере или приблизительно 4 месяцев, по меньшей мере или приблизительно 5 месяцев, по меньшей мере или приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере или приблизительно 9 месяцев или по меньшей мере или приблизительно 12 месяцев после введения одной или нескольких стандартных доз. В определенных вариантах осуществления у индивидуумов, обработанных данным способом, клетки композиции клеток в биологическом образце, необязательно образце крови или сыворотки, достигают фармакокинетических свойств, которые в среднем являются улучшенными по сравнению с группой находящихся в тех же условиях индивидуумов с тем же заболеванием или патологическим состоянием и с введением сходной дозы аутологичной композиции клеток, содержащей Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, но с признаком, указывающим на функцию или фенотип клеток, находящемся ниже порогового значения. В определенных вариантах осуществления фармакокинетическое свойство представляет собой общее воздействие в течение времени (AUC) или пиковое количество клеток в биологическом образце.

[0148] В настоящем документе предоставлены способы прогноза вероятности ответа на композицию терапевтических Т-клеток, где способ включает: (а) оценку композиции с подвергнутыми инженерии клетками, содержащей Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, на признак, указывающий на функцию или фенотип подвергнутых инженерии клеток в композиции, где признак выбран из (i) процентного содержания Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности, и необязательно негативны по CD45RA на поверхности; и/или (ii) процентного содержания CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые способны к продукции IL-2, TNF-альфа и/или IFN-гамма после стимуляции стимулирующим средством; и (b) определение вероятности ответа после введения клеточного терапевтического средства, содержащего дозу подвергнутых инженерии клеток, где, если признак находится на пороговом значении или превышает его, определяют индивидуума как имеющего большую вероятность достижения длительного ответа или увеличенной продолжительности жизни без прогрессирования, необязательно в течение по меньшей мере 3 месяцев после введения

терапевтического средства; или, если признак находится ниже порогового значения, определяют индивидуума, как имеющего небольшую вероятность продемонстрировать длительный ответ или продолжительность жизни без прогрессирования при введении терапевтического средства, где пороговое значение признака выбрано из: (i) точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности; и/или (ii) точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, способны к продукции интерлейкина 2 (IL-2) или TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством; и/или (iii) точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных, из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством.

[0149] В определенных вариантах осуществления клетки композиции клеток являются аутологичными для индивидуума. В определенных вариантах осуществления, если индивидуум определен как имеющий большую вероятность достижения длительного ответа или увеличенной продолжительности жизни без прогрессирования при введении терапевтического средства, индивидууму вводят одну или несколько стандартных доз клеток композиции с подвергнутыми инженерии Т-клетками. В определенных вариантах осуществления одна или несколько стандартных доз всего содержат точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 , точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/Т-клетки), или всех Т-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления одна или несколько стандартных доз всего содержат не более чем приблизительно 5×10^8 , не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/Т-клеток или всех Т-клетки. В определенных вариантах осуществления пороговым значением признака является, что точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности. В определенных вариантах осуществления пороговым значением признака является, что точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или

100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности. В определенных вариантах осуществления пороговым значением признака является, что точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, способны к продукции цитокина, выбранного из интерлейкина 2 (IL-2) и/или TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления пороговым значением признака является, что точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления пороговым значением признака является, что точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции цитокинов интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа.

[0150] В определенных вариантах осуществления, если индивидуума определяют, как имеющего небольшую вероятность достижения длительного ответа или увеличенной продолжительности жизни без прогрессирования, индивидууму вводят терапевтическое средство, выбранное из (а) дозы клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками и средства, способного усилить у индивидуума рост, пролиферацию или эффективность Т-клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками, (b) увеличенной дозы клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками, необязательно увеличенной по сравнению с дозой, вводимой находящемуся в таких же условиях индивидууму с тем же заболеванием или патологическим состоянием, но имеющему большую вероятность достижения увеличенной продолжительности жизни без прогрессирования или длительного ответа на клеточное терапевтическое средство; или (с) альтернативного терапевтического средства для лечения заболевания или патологического состояния, отличного от дозы композиции с подвергнутыми инженерии клетками.

[0151] В определенных вариантах осуществления способ включает введение терапевтического средства, содержащего дозу клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками и средство, способное усилить рост, пролиферацию или эффективность Т-клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками у индивидуума, где средство представляет собой антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфичный к CAR, ингибитор контрольной точки иммунного ответа, модулятор метаболического пути, антагонист рецепторов аденозина, ингибитор киназы, антитело к TGFβ или антитело к TGFβR или цитокин. В определенных вариантах осуществления средство вводят до введения композиции терапевтических Т-клеток, одновременно с ним или после него.

[0152] В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой индивидуума, у которого на момент оценки и/или до введения была определена высокая опухолевая нагрузка или было известно о ее наличии. В определенных вариантах осуществления у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если сумма продуктивных размеров (SPD) опухоли у индивидуума точно или приблизительно превышает 30 см², 40 см², 50 см², 60 см² или 70 см²; и/или у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если содержание С-реактивного белка (CRP) в биологическом образце, необязательно образце сыворотки, полученной у индивидуума, точно или приблизительно превышает 5 миллиграмм на литр, 10 миллиграмм на литр, 15 миллиграмм на литр, 20 миллиграмм на литр, 25 миллиграмм на литр, 30 миллиграмм на литр, 40 миллиграмм на литр или 50 миллиграмм на литр. В определенных вариантах осуществления у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если SPD опухоли у индивидуума точно или приблизительно превышает 50 см². В определенных вариантах осуществления у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если содержание CRP в биологическом образце точно или приблизительно превышает 20 миллиграмм на литр.

[0153] В определенных вариантах осуществления стимулирующее средство представляет собой неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство. В определенных вариантах осуществления неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство представляет собой поликлональное стимулирующее средство. В определенных вариантах осуществления неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее средство содержит РМА/иономицин, связывающее CD3 средство/связывающее CD28 средство, фитогемагглютинин (РНА) или конканавалин А (ConA). В определенных вариантах осуществления неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство содержит РМА/иономицин. В определенных вариантах осуществления стимулирующее средство специфически связывает рекомбинантный рецептор, необязательно, где стимулирующее средство представляет собой специфичный к антигену стимулирующий реагент и/или содержит антиген или его часть, специфически распознаваемые рекомбинантным рецептором. В определенных вариантах осуществления продукцию цитокинов определяют посредством анализа внутриклеточных цитокинов.

[0154] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный антигенный рецептор. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который ассоциирован с клетками или тканями, вовлеченными в заболевание, нарушение или патологическое состояние, специфичен к ним и/или экспрессирован на них. В определенных вариантах осуществления заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль. В определенных вариантах осуществления антиген-мишень

представляет собой опухолевый антиген. В определенных вариантах осуществления антиген-мишень выбран из интегрина $\alpha v \beta 6$ (интегрин $\alpha v \beta 6$), антигена созреваания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидраза 9 (CA9, также известного как CAIX или G250), раковотестикулярного антигена, антигена рака/семенников 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), раковоэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, хемокинового лиганда с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфатпротеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогенов, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолата альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора IL-22 альфа (IL-22R α), рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13R α 2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, представителя А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антигена Льюиса Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белка мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, специфического антигена предстательной железы, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), связанного с тирозинкиназой белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), связанного с тирозинкиназой белка 2 (TRP2, также известного как дофахромтауомераза, дофахром-дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белка опухоли Вильмаса 1 (WT-1), специфичного для патогена или экспрессируемого на патогене антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

[0155] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не являющийся TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и область внутриклеточной сигнализации, содержащую домен внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его фрагмент, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент. В определенных вариантах осуществления фрагмент содержит вариабельные области антитела, связанные гибким линкером. В определенных вариантах осуществления фрагмент содержит scFv. В определенных вариантах осуществления домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции сигнала первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR), и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В определенных вариантах осуществления домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит домен внутриклеточной сигнализации цепи CD3, необязательно цепи CD3-зета (CD3 ζ) или ее сигнальной части. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации. В определенном варианте осуществления область внутриклеточной сигнализации дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальные части. В определенных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен расположен между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации.

[0156] В определенных вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, получаемые у индивидуума. В определенных вариантах осуществления Т-клетки являются аутологичными для индивидуума.

[0157] В настоящем документе предоставлены способы получения композиции терапевтических Т-клеток, включающие (а) инкубацию входящей композиции в стимулирующих условиях с получением, таким образом, стимулированной композиции, где входящая композиция, содержит определенное количество Т-клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, (негативные по маркерам апоптоза ()); и (b) введение рекомбинантного рецептора в клетки из стимулированной композиции с получением, таким образом, композиции с подвергнутыми инженерии клетками, где введение

включает приведение клеток стимулированной композиции в контакт со средством, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В определенных вариантах осуществления негативные по маркерам апоптоза Т-клетки представляют собой или содержат негативные по маркерам апоптоза CD3⁺-клетки, негативные по маркерам апоптоза CD8⁺-клетки, негативные по маркерам апоптоза CD4⁺-клетки или негативные по маркерам апоптоза CD8⁺-клетки и негативные по маркерам апоптоза CD4⁺-клетки. В определенных вариантах осуществления маркер апоптоза представляет собой аннексин V. В определенных вариантах осуществления маркер апоптоза представляет собой активированную каспазу 3. В определенных вариантах осуществления определенное количество Т-клеток содержит по меньшей мере 50×10^6 негативных по маркерам апоптоза Т-клеток, необязательно негативных по маркерам апоптоза CD4⁺ и/или негативных по маркерам апоптоза CD8⁺ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления определенное количество Т-клеток содержит по меньшей мере 100×10^6 негативных по маркерам апоптоза Т-клеток, необязательно негативных по маркерам апоптоза CD4⁺ и/или негативных по маркерам апоптоза CD8⁺ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления определенное количество Т-клеток включает точно или приблизительно от 100×10^6 до точно или приблизительно 500×10^6 негативных по маркерам апоптоза Т-клеток, необязательно негативных по маркерам апоптоза CD4⁺ и/или негативных по маркерам апоптоза CD8⁺ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления определенное количество Т-клеток включает точно или приблизительно 300×10^6 негативных по маркерам апоптоза Т-клеток, необязательно негативных по маркерам апоптоза CD4⁺ и/или негативных по маркерам апоптоза CD8⁺ Т-клеток.

[0158] В определенных вариантах осуществления процентное содержание негативных по маркерам апоптоза Т-клеток такое как процентное содержание всех Т-клеток во входящей композиции составляет более чем или более чем приблизительно 70%, более чем или более чем приблизительно 80%, более чем или более чем приблизительно 90% или более чем или более чем приблизительно 95%. В определенных вариантах осуществления перед инкубацией, выделением, отбором или обогащением негативные по маркерам апоптоза Т-клетки, необязательно негативные по маркерам апоптоза CD4⁺ и/или негативные по маркерам апоптоза CD8⁺ Т-клетки из биологического образца.

[0159] В настоящем документе предоставлены способы получения композиции терапевтических Т-клеток, где способ включает (а) выделение, отбор или обогащение с использованием биологического образца популяции Т-клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, (негативные по маркерам апоптоза ()), необязательно негативные по маркерам апоптоза CD4⁺ и/или негативные по маркерам апоптоза CD8⁺ Т-клетки, с получением, таким образом, входящей композиции; (b) инкубацию входящей композиции в стимулирующих условиях с получением, таким образом, стимулированной композиции; и (c) введение рекомбинантного рецептора в клетки из стимулированной композиции с получением, таким образом, композиции с подвергнутыми инженерии клетками, где

введение содержит приведение клеток стимулированной композиции в контакт со средством, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

[0160] В определенных вариантах осуществления биологический образец первичных Т-клеток получают у индивидуума. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека. В определенных вариантах осуществления биологический образец представляет собой или содержит образец цельной крови, образец лейкоцитарного слоя, образец мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), образец нефракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкофереза. В определенных вариантах осуществления биологический образец содержит продукт афереза или продукт лейкофереза. В определенных вариантах осуществления Т-клетки выделяют, отбирают или обогащают с использованием биологического образца не более чем через 36 часов после его получения у индивидуума. В определенных вариантах осуществления биологический образец подвергают криообработке в присутствии криопротектора не более чем через 36 часов после его получения у индивидуума и размораживают перед выделением, отбором или обогащением клеток, необязательно, где подвергнутый криообработке образец размораживают непосредственно перед или в пределах не более 6 часов, не более 4 часов, не более 2 часов или не более 1 часа перед выделением, отбором или обогащением клеток.

[0161] В определенных вариантах осуществления инкубацию проводят в присутствии одного или нескольких цитокинов, необязательно в среде без сыворотки. В определенных вариантах осуществления один или несколько цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15. В определенных вариантах осуществления 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 определенных вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит первичное средство, которое специфически связывается с участником комплекса TCR, необязательно, которое специфически связывается с CD3, необязательно, где первичное средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления стимулирующий реагент дополнительно содержит вторичные средства, которые специфически связываются с костимулирующей молекулой Т-клетки, необязательно, где костимулирующая молекула выбрана из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS, необязательно, где вторичные средства представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления стимулирующий реагент включает инкубацию с антителом к CD3 и антителом к CD28 или их антигенсвязывающими фрагментами. В определенных вариантах осуществления первичное средство и/или вторичные средства находятся на поверхности твердой подложки. В определенных вариантах осуществления твердая подложка представляет собой или содержит гранулы. В определенных вариантах осуществления первичное средство и вторичные средства иммобилизованы или обратимо связаны на поверхности

реагента олигомерных частиц, содержащих множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина.

[0162] В определенных вариантах осуществления входящую композицию инкубируют в стимулирующих условиях в течение периода от 12 часов до 36 часов, включительно, необязательно точно или приблизительно 24 часа. В определенных вариантах осуществления контактирование проводят посредством вирусной трансдукции, необязательно с использованием ретровирусного вектора, необязательно лентивирусного вектора.

[0163] В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает культивирование композиция с подвергнутыми инженерии составляющими в условиях, способствующих пролиферации и/или росту подвергнутых инженерии клеток, таким образом, получая выходящую композицию, содержащую подвергнутые инженерии Т-клетки. В определенных вариантах осуществления культивирование проводят в присутствии одного или нескольких цитокинов, необязательно в среде без сыворотки. В определенных вариантах осуществления один или несколько цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15. В определенных вариантах осуществления один или несколько цитокинов содержит: 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.

[0164] В определенных вариантах осуществления входящая композиция содержит CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки в отношении CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток от 2:1 до 1:2; или входящая композиция содержит негативные по маркерам апоптоза CD4⁺ Т-клетки и негативные по маркерам апоптоза CD8⁺ Т-клетки в отношении CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток от 2:1 до 1:2. В определенных вариантах осуществления CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки отдельно отбирают, выделяют или обогащают с использованием одного и того же биологического образца или образца из него и комбинируют перед инкубацией. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

[0165] В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит по меньшей мере или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности; и/или по меньшей мере или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые способны к продукции интерлейкина 2 (IL-2) или TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством; и/или по меньшей мере или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных из

интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством. В определенных вариантах осуществления стимулирующее средство представляет собой неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство. В определенных вариантах осуществления неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство представляет собой поликлональное стимулирующее средство. В определенных вариантах осуществления неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее средство содержит РМА/иономицин, связывающее CD3 средство/связывающее CD28 средство, фитогемагглютинин (РНА) или конканавалин А (ConA). В определенных вариантах осуществления неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство содержит РМА/иономицин. В определенных вариантах осуществления стимулирующее средство специфически связывает рекомбинантный рецептор, необязательно, где стимулирующее средство представляет собой специфичный к антигену стимулирующий реагент и/или содержит антиген или его часть, специфически распознаваемые рекомбинантным рецептором. В определенных вариантах осуществления продукцию цитокинов определяют посредством анализа внутриклеточных цитокинов.

Краткое описание чертежей

[0166] На **фиг. 1А** представлено количество $CD3^+$ CAR^+ Т-клеток, находящихся в композициях CAR Т-клеток для введения на уровнях дозы DL1 и DL2. На **фиг. 1В** представлено количество $CD4^+CAR^-$ и $CD8^+CAR^+$ -клеток, $CD4^+CAR^+TNF-\alpha^+$ -клеток и $CD8^+CAR^+TNF-\alpha^+$ -, $CD4^+CAR^+CCR7^+$ -клеток и $CD8^+CAR^+CCR7^+$ -клеток, находящихся в композиции CAR Т-клеток для введения на уровнях дозы DL1 и DL2. На **фиг. 1С** представлено количество $CD4^+CAR^-$ и $CD8^+CAR^+$ -клеток, $CD4^+CAR^+CCR7^+$ -клеток и $CD8^+CAR^+CCR7^+$ -клеток, находящихся в композиции CAR Т-клеток для введения на уровнях дозы DL1 и DL2.

[0167] На **фиг. 2** приведено медианное ($\pm$ квартили) количество экспрессирующих CAR $CD3^+$ -клеток/мкл крови, оцениваемое посредством проточной цитометрии с использованием антитела, специфичного к укороченному рецептору ($CD3$, окружность; $N=87$); или медианное ($\pm$ квартили) количество копий интегрированного трансгена CAR /мкг геномной ДНК, оцениваемой посредством количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) с использованием праймеров, специфичных к посттранскрипционному регуляторному элементу вируса гепатита сурков (WPRE), находящемуся в векторе, кодирующем CAR (кПЦР, квадрат; $N=85$) в образцах крови 87 индивидуумов, которым вводили экспрессирующие CAR к $CD19$ клетки. Порог детекции CAR^+ -клеток при проточной цитометрии устанавливали на ≥ 25 событий в окне CAR^+ , а предел детекции кПЦР составлял $\geq 12,5$ копий трансгена CAR на мкг геномной ДНК.

[0168] На **фиг. 3А** представлен график процентного содержания $CCR7^+$ -клеток (в популяциях $CD4^+ CAR^-$ и $CD8^+ CAR^+$ -клеток) в зависимости от фармакокинетических параметров $CD4^+ CAR^-$ -клеток и $CD8^+ CAR^+$ -клеток, соответственно (как представлено посредством AUC_{0-28} $CD4^+ CAR^-$ или AUC_{0-28} $CD8^+ CAR^+$ -клеток в крови индивидуумов,

которым проводили клеточную терапию). Каждая точка представляет отдельного пациента, с заштриховкой отдельных точек, указывающей на получение пациентом уровня дозирования 1 (DL1) или уровня дозирования 2 (DL2). На **фиг. 3В** представлены аналогичные графики, приведенные отдельно для индивидуумов, у которых наблюдали перед обработкой высокую (при этой оценке, указанную посредством значения суммы произведений диаметров (SPD), превышающего или равного 50 см^2) или низкую (значение SPD менее 50 см^2) опухолевую нагрузку (оцениваем при предшествующей обработке снижающей количество лимфоцитов химиотерапии). На **фиг. 3С** приведен график зависимости количества $\text{CD4}^+\text{CAR}^+\text{CCR7}^+$ -клеток и $\text{CD8}^+\text{CAR}^+\text{CCR7}^+$ -клеток и $\text{AUC}_{0-28} \text{CD4}^+ \text{CAR}^+$ - или $\text{AUC}_{0-28} \text{CD8}^+ \text{CAR}^+$ -клеток в крови индивидуумов, которым проводили клеточную терапию, с коэффициентами корреляции и ассоциированными значениями r . На **фиг. 3D-3J** приведены диаграммы зависимости процентного содержания CCR7^+ или $\text{CCR7}^+\text{CD27}^+ \text{CD4}^+$ или $\text{CD8}^+ \text{CAR}^+ \text{T}$ -клеток и фармакокинетических параметров (AUC_{0-28} и C_{max}) $\text{CD4}^+ \text{CAR}^+ \text{T}$ -клеток (**фиг. 3А, 3D-3F**) и $\text{CD8}^+ \text{CAR}^+ \text{T}$ -клеток (**фиг. 3G-3J**) с коэффициентами корреляции и ассоциированными значениями r .

[0169] На **фиг. 4А-4В** приведена диаграмма зависимости процентного содержания $\text{CCR7}^+\text{CD27}^+$ -клеток в числе $\text{CD4}^+\text{CAR}^+$ клеток и секреции $\text{IFN}\gamma$ (**фиг. 4А**) и IL-2 (**фиг. 4В**) в композиции $\text{CD4}^+ \text{CAR}^+$ при стимуляции антигеном, распознаваемом CAR (CD19).

[0170] На **фиг. 5А-5В** приведена диаграмма зависимости процентного содержания $\text{CCR7}^+\text{CD27}^+$ -клеток в числе $\text{CD8}^+\text{CAR}^+$ клетки и секреции IL-5 (**фиг. 5А**) и IL-13 (**фиг. 5В**) в композиции $\text{CD4}^+ \text{CAR}^+$ -клеток при стимуляции антигеном, распознаваемым CAR (CD19).

[0171] На **фиг. 6А-6D** представлены кривые выживаемости Каплана-Мейера для индивидуумов, которым вводили композиции $\text{CAR}^+ \text{T}$ -клеток, разделенных на группы, которым вводили композиции, с определенным процентным содержанием $\text{CCR7}^+\text{CD27}^+ \text{CAR}^+ \text{T}$ -клеток в числе $\text{CD4}^+ \text{CAR}^+ \text{T}$ -клеток (**фиг. 6А** для продолжительности жизни без прогрессирования, **фиг. 6С** для длительности ответа) и в числе $\text{CD8}^+ \text{CAR}^+ \text{T}$ -клеток (**фиг. 6В** для продолжительности жизни без прогрессирования, **фиг. 6D** для длительности ответа), которое находится выше или ниже определенного порогового уровня.

[0172] На **фиг. 7А-7В** представлены диаграммы размаха с изображением процентного содержание $\text{CCR7}^+\text{CD27}^+$ -клеток в числе $\text{CD4}^+\text{CAR}^+$ -клеток (**фиг. 7А**) или секреции $\text{IFN}\gamma$ $\text{CD4}^+ \text{CAR}^+$ -клетками (**фиг. 7В**) в композициях клеток, вводимых индивидуумам, как функция продолжения развития у индивидуумов синдрома высвобождения цитокинов (CRS; степень 0 по сравнению со степенью 1 или более). На **фиг. 7С-7D** приведены диаграммы размаха с изображением процентного содержания $\text{CCR7}^+\text{CD27}^+$ -клеток в числе $\text{CD4}^+\text{CAR}^+$ клетки (**фиг. 7С**) или секреции $\text{IFN}\gamma$ $\text{CD4}^+ \text{CAR}^+$ -клетками (**фиг. 7D**) в композициях клеток, вводимых индивидуумам, как функция продолжения развития у индивидуумов нейротоксичности (NT; степень 0-2 по сравнению со степенью 3 или более).

[0173] На **фиг. 8А** представлен иллюстративный мультипараметрический анализ фенотипа на основе стохастического вложения соседей с t-распределением (tSNE). На **фиг. 8В** представлена иллюстративная диаграмма проточной цитометрии для подтипов клеток, идентифицированных в анализе (в пределах границ формы, представленной на **фиг. 8А**) по экспрессии CCR7 и CD27.

[0174] На **фиг. 9А-9С** представлена иллюстративная оценка посредством дискриминантного анализа с частичными наименьшими квадратами (PLS-DA) фенотипических и функциональных признаков (**фиг. 9А**) и транскриптомного (**фиг. 9В**) и эпигеномного (**фиг. 9С**) анализов с идентификацией переменных, которые позволяют различать индивидуумов, демонстрирующих полный ответ (CR), и индивидуумов, демонстрирующих прогрессирующее заболевание (PD) или частичный ответ (PR), через 6 месяцев после введения композиции CAR⁺ Т-клеток.

[0175] На **фиг. 10А** представлены диаграммы зависимости частоты CD4⁺CCR7⁺CD27⁺-клеток в композициях до проведения инженерии и частоты CD4⁺CAR⁺CCR7⁺CD27⁺-клеток в композициях с подвергнутыми инженерии клетками (коэффициент ранговой корреляции Спирмена: 0,591). На **фиг. 10В** представлена диаграмма зависимости частоты CD8⁺CCR7⁺CD27⁺-клеток в композициях до проведения инженерии и частота CD8⁺CAR⁺CCR7⁺CD27⁺-клеток в композициях с подвергнутыми инженерии клетками (коэффициент ранговой корреляции Спирмена: 0,357).

[0176] На **фиг. 11А-11D** представлены результаты для композиций CAR⁺ Т-клеток, получаемых посредством иллюстративных расширенных и нерасширенных способов, включающих стимулирующий реагент на гранулах (Bead) и инкубацию в базальных средах (гранулы-базальные среды), или олигомерный стимулирующий реагент (олигомер). На **фиг. 11А** приведено процентное содержание CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, позитивных по CCR7 и CD27. На **фиг. 11В** представлено процентное содержание CCR7⁺CD27⁺-клеток для CD4⁺CAR⁺ Т-клеток. На **фиг. 11С** представлено процентное содержание CCR7⁺CD27⁺-клеток для CD8⁺CAR⁺ Т-клеток. На **фиг. 11D** представлено процентное содержание CCR7⁺CD27⁺-клеток, получаемых у типичного донора посредством иллюстративного расширенного способа на различные сутки способа получения, включая активацию на сутки 1 (активация d1), трансдукцию на сутки 2 (трансдукция d2) и в различные временные точки после начала культивирования (d4 INOC+2, d6 INOC+4, d7 INOC+5).

[0177] На **фиг. 12** представлена клональность Т-клеток в композициях выделенных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток перед проведением инженерии и в терапевтических композициях CD4⁺ и CD8⁺ CAR⁺ Т-клеток после проведения инженерии (применен индекс Шеннона).

[0178] На **фиг. 13А** и **13В** представлены кривые продолжительности жизни без прогрессирования (модель пропорциональных рисков Кокса (сверху) и оптимальное разделение (снизу)) для пациентов с "высоким" или "низким" процентным содержанием клеток, продуцирующих IL-2 или TNFα, соответственно, в CD4⁺/CAR⁺ Т-клетках

терапевтической композиции, как определено с использованием статистики максимально выбранного ранга.

[0179] На **фиг. 14** представлена взаимосвязь клинического исхода с суммой произведений диаметров (SPD) на исходном уровне и уровнями С-реактивного белка (CRP) на исходном уровне у индивидуумов, демонстрирующих полный ответ (CR) (треугольники) или потерю ответа/отсутствие ответа (окружности)) через 6 месяцев.

[0180] На **фиг. 15** представлено процентное содержание IL-2/CD4⁺/CAR⁺-клеток в композициях терапевтических Т-клеток, полученных у индивидуумов с высокими SPD/CRP на исходном уровне, демонстрирующих полный ответ (CR) (треугольники; 1) или потерю ответа/отсутствие ответа (окружности; 0)) через 6 месяцев.

[0181] На **фиг. 16** представлены кривые продолжительности жизни без прогрессирования для иллюстративных пороговых значений тертилей для клеток, позитивных по маркеру апоптоза активированной каспазе 3 во входящих композициях.

[0182] На **фиг. 17** представлен процентное содержание клеток, позитивных по маркеру апоптоза активированной каспазе 3 в обогащенных входящих композициях Т-клеток как функция срока хранения исходных образцов афереза, т.е. образцов, с различным периодом времени (например, в часах) между аферезом и его дополнительной обработкой перед обогащением Т-клеток. На левой диаграмме представлено процентное содержание CD4⁺/активированная каспаза 3⁺-клеток, а на правой диаграмме представлено процентное содержание CD8⁺/активированная каспаза 3⁺-клеток.

Подробное описание

[0183] В настоящем документе предоставлены способы, композиции и промышленные изделия для применения в клеточной терапии, такой как терапия подвергнутыми инженерии Т-клетками для лечения заболеваний и патологических состояний, включая различные опухоли. Предоставляемые варианты осуществления относятся к композициям терапевтических Т-клеток, содержащих подвергнутые инженерии Т-клетки, таких как клетки, подвергнутые инженерии так, чтобы экспрессировать рекомбинантные белки, такие как экспрессируемые рекомбинантные рецепторы, сконструированные для распознавания и/или специфического связывания с молекулами, ассоциированными с заболеванием или патологическим состоянием и приводящие к ответу, такому как иммунный ответ против таких молекул при связывании с такими молекулами. Рецепторы могут включать химерные рецепторы, например, химерные антигенные рецепторы (CAR) и другие трансгенные антигенные рецепторы, включая трансгенные Т-клеточные рецепторы (TCR).

[0184] Предоставляемые варианты осуществления в определенных аспектах относятся к аспектам, в которых фенотипы клеток, например, наличие и/или экспрессия поверхностного маркера и/или отсутствие или дефицит экспрессии поверхностного маркера, связаны с функцией или активностью композиции терапевтических Т-клеток, фармакокинетическими параметрами, например, экспозицией или максимальной концентрацией клеток, риском или вероятностью развития токсичности, такой как

синдром высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичность (NT), и/или исходом клеточной терапии, например, ответом индивидуума, которому вводят композицию Т-клеток, на клеточное терапевтическое средство и/или могут предоставлять информацию об активности композиции терапевтических Т-клеток. В определенных аспектах предоставляемые варианты осуществления основаны на том наблюдении, что определенные фенотипы клеток, например, экспрессия одного или нескольких поверхностных маркеров, продукция одного или нескольких цитокинов, ассоциированы с фармакокинетическими параметрами, вероятностью ответа и/или вероятностью развития токсичности. В определенных вариантах осуществления экспрессия и/или отсутствие экспрессии поверхностных клеточных маркеров, таких как рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7), CD27 и CD45RA или их сочетаний в композиции Т-клеток для введения, например, композиции лекарственных средств, положительно или отрицательно коррелирует с фармакокинетическими параметрами и/или исходом в виде ответа или токсикологическим исходом. В определенных аспектах в настоящем документе отражено, что фенотип и функциональные признаки, ассоциированные с менее дифференцированным Т-клеточным продуктом или продуктов, обогащенным подгруппами подобных наивным Т-клеток или центральных Т-клеток памяти, коррелируют или демонстрируют взаимосвязь с улучшенными фармакокинетическими свойствами или ответом, такими как длительность ответа и/или продолжительность жизни без прогрессирования, после введения индивидууму.

[0185] Аспекты предоставляемых вариантов осуществления также относятся к введению или предоставлению стандартной дозы, содержащей определенное количество, отношение, процентное содержание и/или долю клеток, которая представляет собой функцию количества клеток определенного фенотипа, такой как фенотип, характерный для клеточной популяции, включая применение в сочетании с дозированием композиции терапевтических Т-клеток. В определенных аспектах предоставляемые варианты осуществления обеспечивают стабильное дозирование и/или введение. В определенных аспектах предоставляемые варианты осуществления можно использовать для оценки вероятности определенного исхода и/или значения определенного фармакокинетического параметра, риска токсичности и/или ответа, активности или эффективности клеточной терапии. В определенных аспектах предоставляемыми способами можно контролировать, снижать тяжесть или снижать риск токсичности у индивидуума, которому вводят дозу композиции терапевтических Т-клеток, при этом обеспечивая активность композиции Т-клеток. Также предоставлены промышленные изделия, содержащие клетки и разработанные для введения в соответствии с такими схемами лечения.

[0186] В определенных вариантах осуществления предоставляемые способы, дозы, стандартные дозы, композиции и промышленные изделия основаны на наблюдениях, что при определении требуемой дозы клеточной терапии и/или выпуска или получения композиции клеток для терапевтического средства предпочтительным может являться учет определенных фенотипов, например, экспрессии поверхностных маркеров и их

сочетаний. В определенных пригодных способах дозы основаны на определенных количествах конкретных типов клеток, таких как клетки, сконструированные для проявления конкретной активности, таких как клетки, позитивные по сконструированному рецептору. Например, в определенных пригодных способах и дозах доза основана на наблюдаемой или предполагаемой зависимости, связи между количеством (или количеством на массу тела пациента) жизнеспособных подвергнутых инженерии Т-клеток или их подмножества, такого как жизнеспособных, цитотоксических (например, $CD8^+$) подвергнутых инженерии Т-клеток. В различных контекстах такие количества могут иметь связь с результатами в виде эффективности и/или безопасности, такими как ответ и/или риск токсичности, такой как нейротоксичность, отек головного мозга и CRS. В настоящем документе предоставлены варианты осуществления на основе наблюдения, что, тем не менее, такие показатели в определенных контекстах не всегда в достаточной степени ассоциированы с фармакологическими параметрами у индивидуума, риском токсичности, CRS или NT, особенно без учета других переменных. Таким образом, подходы для определения дозы и оценки продукта для выпуска, которые основаны только на таких показателях, могут быть не полностью удовлетворительными. Например, такие подходы в определенных контекстах могут не позволять достигать определенного терапевтического диапазона или окна для безопасной и эффективной клеточной терапии. В настоящем документе предоставлены способы (включая лечение, дозирование, определение дозы и способы анализа), терапевтические композиции и промышленные изделия, которые устраняют такие недостатки.

[0187] В определенных аспектах предоставляемые варианты осуществления позволяют вводить контролируемую и стабильную дозу клеток, таким образом, минимизируя вариацию исходов в виде эффективности и/или безопасности у индивидуумов. В определенных аспектах контроль дозы клеток на основе определенное количества, отношения, процентного содержания и/или долей конкретного подмножества клеток, например, на основе фенотипа клеток, позволяет понять влияние подмножеств клеток с конкретными фенотипами на здоровье, активность и/или эффективность клеток, содержащихся в терапевтических композициях. Такие подходы можно использовать для определения и/или подсчета стабильных и точных эффективных доз клеток в клеточной терапии и/или контроле фармакокинетических параметров клеточной терапии. Предоставлены способы определения таких доз, включая стандартные дозы для введения, на основе количества, отношения, процентного содержания и/или долей клеток, экспрессирующих конкретные поверхностные маркеры и/или обладающих конкретными фенотипами, промышленные изделия и наборы, содержащие дозы, определенные такими способами, и инструкции для введения и связанные способы лечения. В определенных аспектах предоставляемые варианты осуществления обеспечивают идентификацию признаков клеток в композиции с подвергнутыми инженерии клетками и потенциальную ассоциацию с фармакокинетикой (РК) и клиническими исходами, такими как ответ и токсичность, на основе стабильности и жесткого контроля количества $CD4^+$ и $CD8^+ CAR^+$

Т-клеток и, необязательно, их подмножеств, которые представляют собой CCR7⁺, CD27⁺ и/или CD45RA⁻, в терапевтической композиции для введения индивидуумам. Такие стабильность и жесткий контроль общего количества CAR⁺-клеток в композиции клеток для введения может обеспечивать основу для стратегий оценки и контроля других характеристик клеток в композиции для введения с подвергнутыми инженерии клетками.

[0188] В определенных аспектах предоставляемые варианты осуществления позволяют проводить введение композиций CAR⁺ Т-клеток, которые демонстрируют низкую вариабельность, являются чистыми и содержат точную дозу, позволяя определять связь между различными признаками клеток и клиническими исходами, такими как ответ и токсичность. В определенных аспектах предоставляемые варианты осуществления основаны на наблюдение, что популяции клеток, экспрессирующие маркеры, ассоциированные с определенными фенотипами, такими как менее дифференцированный фенотип, демонстрируют определенные функциональные профили (например, продукцию цитокинов). В определенных аспектах CCR7⁺CD27⁺ CD4⁺ CAR Т-клетки продуцируют сниженный уровень IFN γ и повышенный уровень IL-2, и, в определенных аспектах, CCR7⁺CD27⁺ CD8⁺ CAR Т-клетки продуцируют сниженные уровни IL-5 и IL-13, например, после стимуляции CAR специфичным антигеном. В определенных вариантах осуществления водимые композиции клеток, содержащие CAR⁺ Т-клетки, в которых определенный процент клеток в композиции демонстрирует менее дифференцированное состояние и/или является CCR7⁺CD27⁺-клетками, ассоциированы с требуемыми или улучшенными фармакокинетическими параметрами, событиями безопасности и ответом увеличенной длительности, например, по сравнению с композициями, содержащими меньший процент таких популяций клеток.

[0189] Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, на которые ссылаются в настоящей заявке полностью включены в качестве ссылки для всех целей в той же степени как, если бы каждая отдельная публикация была индивидуально включена в качестве ссылки. Если определение, приводимое в настоящем документе, отличается или иным образом не соответствует определению, приводимому в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, включенных в настоящий документ в качестве ссылки, определение, приводимое в настоящем документе, превалирует над определением, включенным в настоящий документ в качестве ссылки.

[0190] Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для организационных целей, и их не следует рассматривать как ограничивающие описываемый объект изобретения.

I. ДОЗЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЗЫ В ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЯХ Т-КЛЕТОК

[0191] В настоящем документе предоставлены способы, композиции и промышленные изделия для применения в связи с клеточной терапией, такой как терапия подвергнутыми инженерии Т-клетками для лечения заболеваний и патологических

состояний, включая различные опухоли. Предоставляемые варианты осуществления относятся к способам определения дозы для введения индивидууму, связанным способам лечения, композициям, содержащим дозы клеток и связанным промышленным изделиям и наборам. Предоставляемые варианты осуществления в определенных аспектах относятся к аспектам, в которых фенотипы клеток, например, присутствие и/или экспрессия поверхностного маркера, отсутствие или дефицит экспрессии поверхностного маркера и/или способность к продукции одного или нескольких цитокинов (например, IL-2) у клеток в композиции для введения, связана, коррелирует или ассоциирована со значениями или измерениями фармакокинетических параметров, например, экспозицией или максимальной концентрацией клеток. В определенных аспектах фенотипы и/или параметры также связаны, коррелируют или ассоциированы с активностью и/или функцией клеток и/или вероятностью развития токсичности, такой как синдром высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичность (NT) и/или исходом клеточной терапии, например, ответом на клеточное терапевтическое средство, у индивидуума, которому вводят композицию Т-клеток, таким как длительность ответа и продолжительность жизни без прогрессирования.

[0192] В определенных аспектах предоставляемые варианты осуществления включают определение и/или введение дозы композиции клеток, например, одной или нескольких стандартных доз композиции клеток, и/или объема, соответствующего таким стандартным дозам. В определенных аспектах доза клеток обогащена, например, обладает высоким или относительно высоким процентом биологически активных подвергнутых инженерии Т-клеток с конкретным фенотипом. В определенных аспектах доза зависит от количества биологически активных подвергнутых инженерии Т-клеток с конкретным фенотипом. В определенных аспектах биологически активный относится к свойству клеток не запрограммированных на гибель клеток, например, неапоптотические клетки или клетки не демонстрирующие признаков вхождения на путь апоптоза. В определенных аспектах доза зависит от количества биологически активных подвергнутых инженерии CD8⁺ Т-клеток с конкретным фенотипом, и/или, доза зависит от общего количества биологически активных подвергнутых инженерии Т-клеток с конкретным фенотипом.

[0193] В определенных вариантах осуществления способы обеспечивают содержание в стандартной дозе относительно стабильных количеств, долей, отношений и/или процентного содержания подвергнутых инженерии клеток с конкретным фенотипом в одной или нескольких конкретных композициях. В определенных аспектах стабильность ассоциирована или связана с относительно стабильной активностью, функцией, фармакокинетическими параметрами, токсикологическим исходом и/или исходом в виде ответа. В определенных вариантах осуществления процент подвергнутых инженерии клеток, способных к стабильной активности, функции, достижению определенных фармакокинетических параметров, токсикологическому исходу и/или исходу в виде ответа (например, длительному ответу, длительной продолжительности жизни без прогрессирования), составляет или содержит по меньшей мере или приблизительно или

точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества подвергнутых инженерии клеток (например, Т-клеток) в композиции или общего количества подвергнутых инженерии клеток (например, Т-клеток) в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивные по CCR7 и/или CD27 на поверхности, необязательно дополнительно негативны по экспрессии CD45RA на поверхности. В определенных вариантах осуществления подвергнутые инженерии клетки (например, Т-клетки) дополнительно негативны по маркеру апоптоза, такому как активированная каспаза 3 или аннексин V. В определенных вариантах осуществления процент подвергнутых инженерии клеток, способных к стабильным активности, функции, достижению определенных фармакокинетических параметров, токсикологическому исходу в и/или исходу в виде ответа (например, длительному ответу, длительной продолжительности жизни без прогрессирования), составляет или содержит по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% общего количества подвергнутых инженерии клеток (например, Т-клеток) в композиции или общего количества подвергнутых инженерии клеток (например, Т-клеток) в композиции, экспрессирующей рекомбинантный рецептор, негативный по маркерам апоптоза (например, каспаза-3, аннексин V). В определенных вариантах осуществления процент подвергнутых инженерии клеток, способных к стабильным активности, функции, достижению определенных фармакокинетических параметров, токсикологическому исходу и/или исходу в виде ответа (например, длительному ответу, длительной продолжительности жизни без прогрессирования), составляет или содержит по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества подвергнутых инженерии CD4⁺ Т-клеток в композиции или общего количества подвергнутых инженерии CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, способный к продукции цитокина, выбранного из интерлейкина 2 (IL-2) и/или TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления процент подвергнутых инженерии клеток, способных к стабильным активности, функции, достижению определенных фармакокинетических параметров, токсикологическому исходу и/или исходу в виде ответа (например, длительному ответу, длительной продолжительности жизни без прогрессирования), составляет или содержит по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества подвергнутых инженерии CD4⁺ Т-клеток в композиции или общего количества подвергнутых инженерии CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления подвергнутые инженерии клетки композиции, способные к стабильным активности, функции, достижению определенных фармакокинетических параметров, токсикологическому исходу и/или исходу в виде ответа (например,

длительному ответу, длительной продолжительности жизни без прогрессирования), представляют собой или содержат один или несколько фенотипов, описываемых в настоящем документе. Таким образом, в определенных вариантах осуществления процент подвергнутых инженерии клеток, способных к стабильным активности, функции, достижению определенных фармакокинетических параметров, токсикологическому исходу и/или исходу в виде ответа (например, длительному ответу, длительной продолжительности жизни без прогрессирования), представляет собой или содержит комбинацию процентов этих фенотипов. В определенных вариантах осуществления композиция для применения в качестве терапевтической композиции, выбрана на основе процентного содержания клеток, содержащих один или несколько фенотипов в композиции (например, выходящей композиции).

[0194] В определенных аспектах у множества индивидуумов композиции и/или дозы, количества, доли, отношения и/или процентное содержание являются относительно стабильными, например, количество или отношение клеток с конкретным фенотипом, например, экспрессирующих CCR7 (CCR7⁺), и/или со способностью к продукции одного или нескольких цитокинов, в композиции или стандартной дозе, варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%. В определенных аспектах количество или отношение клеток с конкретным фенотипом, например, экспрессирующих CCR7 (CCR7⁺), и/или со способностью к продукции одного или нескольких цитокинов, в композиции или стандартной дозе, варьирует не более чем на 20% или не более чем 10% или не более чем 5% от среднего из указанного количества или отношения во множестве композиций Т-клеток, получаемых данным способом, и/или варьирует от такого среднего не более чем на одно стандартное отклонение, или варьирует не более чем на 20% или не более чем 10% или не более чем 5% во множестве композиций Т-клеток или определенных дозах.

[0195] В определенных вариантах осуществления способы включают определение и/или введение одной или нескольких стандартных доз клеток, например, подвергнутых инженерии Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, такой как CAR. В определенных аспектах способы включают введение одной или нескольких стандартных доз клеток, где одна или несколько стандартных доз клеток обогащены и/или содержат высокий или относительно высокий процент клеток с конкретным фенотипом, таким как фенотип с конкретным поверхностным маркером и/или индикаторная функциональная активность, такая как способность к продукции одного или нескольких цитокинов. В определенных аспектах стандартную дозу определяют на основе количества, процентного содержания, отношения, частоты и/или доли конкретного подмножества подвергнутых инженерии Т-клеток, например, клеток с конкретным фенотипом, таким как фенотип с конкретным поверхностным маркером и/или индикаторной функциональной активностью, такой как способность к продукции одного или нескольких цитокинов. В определенных вариантах осуществления композицию подвергнутых инженерии или терапевтических клеток можно получать способом, который позволяет получать

выходящую композицию, содержащую или обогащенную клетками с такими фенотипами или функциональными признаками, например, по сравнению с исходным материалом или входящей композицией, используемой для получения выходящей композиции с подвергнутыми инженерии составляющими. Иллюстративные фенотипы и функциональные признаки клеток композиции подвергнутых инженерии или терапевтических клеток, такой как выходящая композиция, получаемая способами получения подвергнутых инженерии клеток, содержащихся в одной или нескольких стандартных доз любой такой композиции, описаны в настоящем документе.

[0196] В определенных аспектах клеточный маркер включает маркеры служащие показателем здоровья, жизнеспособности и/или апоптотического состояния клеток. В определенных аспектах иллюстративные маркеры включают CD3, CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA, аннексин V или активированную каспазу 3. В определенных аспектах иллюстративные маркеры включают CCR7, CD27 и/или CD45RA. В определенных аспектах иллюстративные маркеры включают CCR7 и/или CD27. В определенных аспектах иллюстративный маркер представляет собой CCR7. В определенных аспектах иллюстративный маркер представляет собой CD27.

[0197] В определенных аспектах предоставляемые способы также включают оценку терапевтической композиции на фенотипы клеток, например, экспрессию маркеров, например, CD3, CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA, аннексина V или активированной каспазы 3. В определенных вариантах осуществления фенотип включает антиген-специфичные функции. В определенных вариантах осуществления фенотип включает продукцию или секрецию цитокина, например, при стимуляции антигеном, который специфически связывает и/или распознает рекомбинантный рецептор, например, CAR. В определенных вариантах осуществления фенотип включает продукцию цитокинов, например, цитокинов, ассоциированных с конкретными типами клеток, таких как цитокины, ассоциированные с подтипами Th1, Th2, Th17 и/или T_{reg}.

[0198] В определенных аспектах предоставляемые способы включают определение подходящей дозы, например, одной или нескольких стандартных доз терапевтической композиции, содержащей подвергнутые инженерии Т-клетки для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием. В определенных аспектах способы также включают оценку количества, процентного содержания, отношения, частоты и/или доли конкретного подмножества подвергнутых инженерии Т-клеток, например, клеток с конкретным фенотипом, таким как фенотип с конкретным поверхностным маркером, в терапевтической композиции, содержащий подвергнутые инженерии Т-клетки. В определенных вариантах осуществления предоставляемые способы включают оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и CCR7 (рецептор⁺/CCR7⁺).

[0199] В определенных вариантах осуществления предоставляемые способы включают оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8+ и/или CD4+ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CD27 и/или CD45RA. Друг иллюстративные фенотипические маркеры для оценки и/или способы для оценки описаны ниже, например, в разделе I.A. В определенных аспектах стандартную дозу можно определять на основе любой из этих оценок. В определенных аспектах способы также включают оценку количества, процентного содержания, отношения, частоты и/или доли клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) или суррогатного маркера рекомбинантного рецептора. Дозы, например, одна или несколько стандартных доз, можно определять на основе оценки на количество, процентное содержание, отношение, частоту и/или долю любого из фенотипических маркеров, описываемых в настоящем документе.

A. Определение фенотипов клеток

[0200] В определенных вариантах осуществления фенотипы клеток, или уровень, или процентное содержание таких фенотипов в композиции клеток, коррелируют или ассоциированы с активностью, и/или функцией клеток, и/или вероятностью развития токсичности, такой как синдром высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичность (NT), и/или исходом клеточной терапии, например, ответом на клеточное терапевтическое средство, индивидуума, которому вводят композицию Т-клеток, таким как длительность ответа и продолжительность жизни без прогрессирования. В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие клетки с определенными фенотипами, а более конкретно, процентное содержание клеток с такими определенными фенотипами, коррелируют с клиническими исходами, такими как длительный ответ и/или продолжительность жизни без прогрессирования. В определенных вариантах осуществления фенотип определяют посредством оценки присутствия или отсутствия одной или нескольких характеристических молекул, включая поверхностные молекулы и/или молекулы, которые могут накапливать или продуцировать клетки или субпопуляция клеток в композиции Т-клеток. В определенных вариантах осуществления фенотип, прямо или противоположно, указывает на биологическую активность клеток или популяции клеток в композиции Т-клеток или является ее показателем. В определенных вариантах осуществления фенотип может включать активность клеток, например, продукцию признака (например, цитокина) в ответ на стимул. В определенных вариантах осуществления оценку композиции клеток проводят идентификации, детекции или количественного анализа фенотипа композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления измерения в композиции клеток проводят для идентификации, детекции или количественного анализа присутствия, отсутствия, степени экспрессии или уровня характеристической молекулы.

[0201] Полагают, что фенотип композиции клеток (например, композиции с подвергнутыми инженерии Т-клетками) в определенных случаях может зависеть от множества факторов, включая в качестве неограничивающих примеров, фенотип исходного клеточного материала (например, продукта афереза или продукта лейкофереза), используемого для получения композиции клеток, и фенотип клеточного материала, подвергнутый обработке с получением композиции клеток. Таким образом, в определенных вариантах осуществления фенотип оценивают у клеток исходного материала и/или материала, подвергнутого обработке с получением композиции клеток, а также конечной композиции клеток.

[0202] В определенных вариантах осуществления фенотип является показателем жизнеспособности клетки. В определенных вариантах осуществления фенотип является показателем отсутствия апоптоза, отсутствия ранних стадий апоптоза или отсутствия поздних стадий апоптоза. В определенных вариантах осуществления фенотипом является отсутствие признака, что указывает на отсутствие апоптоза, ранних стадий апоптоза или поздних стадий апоптоза. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой фенотип субпопуляции или подмножества Т-клеток, таких как экспрессирующие рекомбинантный рецептор Т-клетки (например, CAR⁺ Т-клетки), CD8⁺ Т-клетки или CD4⁺ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой фенотип клеток, которые не являются активированными и/или у которых отсутствует или снижена экспрессия одного или нескольких маркеров активации. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой фенотип клеток, которые не являются истощенными и/или у которых отсутствует или снижена экспрессия одного или нескольких маркеров истощения.

[0203] В определенных вариантах осуществления на фенотип указывают присутствие, отсутствие или уровень экспрессии в клетке одной или нескольких характеристических молекул, таких как определенные поверхностные маркеры, указывающие на фенотип, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры, указывающие на фенотип, или нуклеиновые кислоты, указывающие на фенотип, или другие молекулы или признаки, указывающие на фенотип. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии одной или нескольких характеристических молекул. В определенных вариантах осуществления характеристические молекулы в качестве неограничивающих примеров включают поверхностный маркер, например, мембранный гликопротеин или рецептор; маркер, ассоциированный с апоптозом или жизнеспособностью, или характеристическую молекулу, которая указывает на статус иммунных клеток, например, маркер, ассоциированный с активацией, истощением или фенотипом зрелой или наивной клетки. В определенных вариантах осуществления для определения количества клеток фенотипа можно использовать любой известный способ оценки или определения, подсчета и/или определения количества клеток на основе характеристических молекул.

[0204] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии одной или нескольких характеристических молекул в клетке. В определенных вариантах осуществления на наличие экспрессии указывает детектируемое количество характеристической молекулы в клетке. В определенных вариантах осуществления детектируемое количество представляет собой любое детектированное количество характеристической молекулы в клетке. В конкретных вариантах осуществления детектируемое количество представляет собой количество в клетке, превышающее фоновое, например, фоновые окрашивание, сигнал и т.д. В определенных вариантах осуществления наличие экспрессии представляет собой количество характеристической молекулы, превышающее пороговое значение, например, заданное пороговое значение. Подобным образом, в конкретных вариантах осуществления клетка с отсутствием экспрессии характеристической молекулы может представлять собой любую клетку, у которой не определено наличия экспрессии, или представляет собой клетку, у которой отсутствует детектируемое количество характеристической молекулы или детектируемое количество характеристической молекулы выше фонового уровня. В определенных вариантах осуществления у клетки отсутствует экспрессия характеристической молекулы, если количество характеристической молекулы находится ниже порогового значения. Специалисту в данной области понятно, как определять пороговое значение, чтобы определять наличие и/или отсутствие экспрессии характеристической молекулы, в рамках стандартной практики, и что пороговые значения можно определять в соответствии с конкретными параметрами, в качестве неограничивающих примеров, анализом или способом детекции, идентификации характеристической молекулы, реагентами, используемыми для детекции, и оборудованием.

[0205] Примеры способов, которые можно использовать для детекции характеристической молекулы и/или анализа фенотипа клеток, в качестве неограничивающих примеров включают биохимический анализ; иммунохимический анализ; анализ изображений; цитоморфологический анализ; молекулярный анализ, такой как ПЦР, секвенирование, высокопроизводительное секвенирование, определение метилирования ДНК; протеомный анализ, такой как определение профиля гликозилирования и/или фосфорилирования белков; геномный анализ; эпигеномный анализ (например, ChIP-seq или ATAC-seq); транскриптомный анализ (например, RNA-seq) и любое их сочетание. В определенных вариантах осуществления способы могут включать оценку репертуара иммунных рецепторов, например, репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR). В определенных аспектах определение любого из фенотипов можно проводить высокопроизводительными, автоматизированными и/или основанными на анализе единичных клеток способами. В определенных аспектах для идентификации одной или нескольких молекулярных сигнатур можно использовать крупномасштабные или полногеномные способы. В определенных аспектах крупномасштабные или полногеномные способы можно использовать для идентификации молекулярных

сигнатур, которые ассоциированы с исходами терапии, например, эффективностью и безопасностью, или фармакокинетическими параметрами. В определенных аспектах можно определять одну или несколько молекулярных сигнатур, например, экспрессию характеристических РНК или белков в клетке. В определенных вариантах осуществления молекулярные характеристики фенотипа анализируют посредством анализа изображений, ПЦР (включая стандартную и все варианты ПЦР), микропанелей (включая в качестве неограничивающих примеров ДНК-микропанель, MMchips для микроРНК, микропанель белков, микропанель клеток, микропанель антител и панель углеводов), секвенирования, детекции биомаркеров или способами определения профиля метилирования ДНК или гликозилирования белков. В конкретных вариантах осуществления характеристическая молекула представляет собой полипептид, т.е. белок. В определенных вариантах осуществления характеристическая молекула представляет собой полинуклеотид.

[0206] В определенных вариантах осуществления наличие или отсутствие экспрессии характеристической молекулы определяют посредством инкубации клеток с одним или несколькими антителами или другим связывающим средством, которые специфически связываются с одним или несколькими поверхностными маркерами, экспрессируемыми (маркер⁺) или экспрессируемыми на относительно высоком уровне (маркер^{high}) на отбираемых посредством положительного или отрицательного отбора клетках, соответственно. В конкретных вариантах осуществления наличие или отсутствие экспрессии определяют посредством проточной цитометрии, иммуногистохимии или любого другого подходящего способа детекции специфических маркеров.

[0207] В конкретных вариантах осуществления экспрессию характеристической молекулы оценивают посредством проточной цитометрии. Проточная цитометрия представляет собой основанная на лазерах или сопротивлении биофизическая технология, применяемая при подсчете клеток, сортировке клеток, детекции биомаркеров и белковой инженерии, посредством суспендирования клеток в потоке жидкости и пропускания их через устройство с электронной детекцией. Это обеспечивает одновременный многопараметрический анализ физических и химических характеристик вплоть до нескольких тысяч частиц в секунду.

[0208] Данные, получаемые посредством проточных цитометров, можно нанести на диаграмму в одном измерении с получением гистограммы или на двухмерные точечные диаграммы или даже в трех измерениях. Области на этих диаграммах на основе интенсивности флуоресценции можно последовательно разделять, получая ряд извлечений подмножеств, называемых "окнами". Существуют определенные протоколы гейтирования для диагностических и клинических целей, особенно в связи с иммунологией. Диаграммы часто получают в логарифмических шкалах. Вследствие перекрывания спектров излучения разных флуоресцентных красителей сигналы на детекторах следует компенсировать электронными, а также вычислительными способами. Данные, получаемые с использованием проточного цитометра, можно анализировать с использованием программного обеспечения, например, JMP (статистическое программное

обеспечение), WinMDI, Flowing Software и доступный через веб-интерфейс Cytobank), Cellcicon, FCS Express, FlowJo, FACSDiva, CytoPaint (также известный как Paint-A-Gate), VenturiOne, CellQuest Pro, Infinicyt или Cytospec.

[0209] Проточная цитометрия представляет собой стандартный способ в данной области и специалист легко поймет, как разрабатывать или адаптировать протоколы для детекции одной или нескольких характеристических молекул и анализа данных для определения экспрессии одной или нескольких характеристических молекул в популяции клеток. Стандартные протоколы и способы проточной цитометрии можно найти в Loyd "Flow Cytometry in Microbiology; Practical Flow Cytometry by Howard M. Shapiro; Flow Cytometry for Biotechnology by Larry A. Sklar, Handbook of Flow Cytometry Methods by J. Paul Robinson, et al., Current Protocols in Cytometry, Wiley-Liss Pub, Flow Cytometry in Clinical Diagnosis, v4, (Carey, McCoy, and Keren, eds), ASCP Press, 2007, Ormerod, M.G. (ed.) (2000) Flow Cytometry -A practical approach. 3rd edition. Oxford University Press, Oxford, UK, Ormerod, M.G. (1999) Flow Cytometry. 2nd edition. BIOS Scientific Publishers, Oxford., and Flow Cytometry -A basic introduction. Michael G. Ormerod, 2008.

[0210] В определенных вариантах осуществления клетки сортируют по фенотипу для дополнительного анализа. В определенных вариантах осуществления клетки различных фенотипов в пределах одной и той же композиции клеток сортируют посредством активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS). FACS представляет собой специализированный тип проточной цитометрии, который позволяет сортировать гетерогенную смесь клеток по двум или более контейнерам, по одной клетке за один раз на основе конкретных светорассеяния и флуоресцентных характеристик каждой клетки. Она представляет собой эффективное научное устройство так как она обеспечивает быструю, объективную и количественную запись флуоресцентных сигналов от отдельных клеток, а также физическое разделение клеток, представляющих особый интерес.

[0211] В определенных вариантах осуществления фенотип включает количество всех Т-клеток или количество всех $CD3^+$ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления композиция Т-клеток, например, композиция терапевтических Т-клеток, которая содержит клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор или CAR, может содержать один или несколько различных подтипов Т-клеток. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает характеристики подтипа Т-клеток. Различные популяции или подтипы Т-клеток в качестве неограничивающих примеров включают эффекторные Т-клетки, хелперные Т-клетки, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки, наивные Т-клетки, $CD4^+$ -клетки и $CD8^+$ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления подтип Т-клеток можно идентифицировать, посредством детекции присутствия или отсутствия характеристической молекулы. В определенных вариантах осуществления характеристическая молекула представляет собой поверхностный маркер, который можно использовать для идентификации подтипа Т-клеток.

[0212] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой наличие или высокий уровень экспрессии одной или нескольких характеристических молекул, которые представляют собой поверхностные маркеры, например, CD3, CD4, CD8, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD4, CD8, CD45RA, и/или CD45RO. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой поверхностный маркер Т-клеток или субпопуляции или подмножества Т-клеток, например, на основе наличия экспрессии поверхностных маркеров из одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой наличие или высокий уровень экспрессии одной или нескольких характеристических молекул, которые представляют собой поверхностные маркеры, например, рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7), кластер дифференцировки 27 (CD27), кластер дифференцировки 28 (CD28) и кластер дифференцировки 45 RA (CD45RA). В определенных вариантах осуществления маркеры фенотипа включают CCR7, CD27, CD28, CD44, CD45RA, CD62L и L-селектин. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие экспрессии одной или нескольких характеристических молекул, которые представляют собой поверхностные маркеры, например, CD3, CD4, CD8, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой поверхностный маркер Т-клеток или субпопуляции или подмножества Т-клеток, например, на основе отсутствия экспрессии поверхностного маркера из одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD3⁻, CD4⁻, CD8⁻, CD28⁻, CD62L⁻, CCR7⁻, CD27⁻, CD127⁻, CD4⁻, CD8⁻, CD45RA⁻ и/или CD45RO⁻. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие экспрессии одной или нескольких характеристических молекул, которые представляют собой поверхностные маркеры, например, рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7), кластер дифференцировки 27 (CD27), кластер дифференцировки 28 (CD28) и кластер дифференцировки 45 RA (CD45RA). В определенных вариантах осуществления маркеры фенотипа включают CCR7, CD27, CD28, CD44, CD45RA, CD62L и L-селектин.

[0213] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии CD27, CCR7 и/или CD45RA. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой CCR7⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой CD27⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой CCR7⁺/CD27⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой CD45RA⁻. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой CCR7⁺/CD45RA⁻. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой CD27⁺/CD45RA⁻. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой CCR7⁺/CD27⁺/CD45RA⁻.

[0214] В определенных вариантах осуществления поверхностный маркер указывает на экспрессию рекомбинантного рецептора, например, CAR. В конкретных вариантах осуществления поверхностный маркер представляет собой экспрессию рекомбинантного рецептора, например, CAR, который, в определенных аспектах, можно определять с использованием антитела, такого как антиидиотипическое антитело. В определенных вариантах осуществления поверхностный маркер, который указывает на экспрессию рекомбинантного рецептора представляет собой суррогатный маркер. В конкретных вариантах осуществления такой суррогатный маркер представляет собой поверхностный белок, который модифицирован так, чтобы иметь небольшую или не иметь активности. В определенных вариантах осуществления суррогатный маркер кодирует тот же нуклеотид, который кодирует рекомбинантный рецептор. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер, необязательно с разделением внутренним участком связывания рибосомы (IRES), или с нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает прорыв рибосомы, например, последовательность 2A, такая как T2A (например, SEQ ID NO: 6 и 17), P2A (например, SEQ ID NO: 18 и 19), E2A (например, SEQ ID NO:20) или F2A (например, SEQ ID NO:21). В определенных случаях в применении к подвергнутым инженерии клеткам для обеспечения детекции или отбора клеток и, в определенных случаях, также для активации суицида клетки, можно использовать внешние маркерные гены.

[0215] Иллюстративные суррогатные маркеры могут включать укороченные полипептиды клеточной поверхности, такие как укороченный рецептор эпидермального фактора роста 2 человека (tHER2), укороченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFRt, иллюстративная последовательность EGFRt указана в SEQ ID NO:7 или 16) или простатспецифический мембранный антиген (PSMA) или их модифицированные формы. EGFRt может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимабом (эрбитукс®) или другим терапевтическим антителом к EGFR или связывающийся с ним молекулой, которые можно использовать для идентификации или отбора клеток, подвергнутых инженерии с использованием конструкции EGFRt и рекомбинантного рецептора, такого как химерный антигенный рецептор (CAR), и/или для удаления или отделения клеток, экспрессирующих этот рецептор. См. патент США № 8802374 и Liu et al., *Nature Biotech.* 2016 April; 34(4): 430-434). В определенных аспектах маркер, например, суррогатный маркер, включает весь или часть (например, укороченную форму) CD34, NGFR или рецептор эпидермального фактора роста (например, tEGFR). В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как последовательность расщепляемого линкера, например, T2A. Например, маркер, и необязательно линкерная последовательность, могут являться любыми, как описано в публикации РСТ № WO2014031687. Например, маркер может представлять собой

укороченный EGFR (tEGFR), который необязательно связан с линкерной последовательностью, такой как последовательность расщепляемого линкера T2A. Иллюстративный полипептид для укороченного EGFR (например, tEGFR) содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:7 или 16 или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательностей с SEQ ID NO:7 или 16 по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

[0216] В определенных вариантах осуществления маркер представляет собой или содержит флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперсложенный GFP, красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-зеленый флуоресцентный белок (BFP), усиленный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP) и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты и оптимизированные по кодонам и/или усиленные варианты флуоресцентных белок. В определенных вариантах осуществления маркер представляет собой или содержит фермент, такой как люцифераза, ген *lacZ* *E. coli*, щелочная фосфатаза, секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Иллюстративные светоиспускающие репортерные гены включают люциферазу (*luc*), β -галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), β -глюкуронидазу (GUS) или их варианты.

[0217] В определенных вариантах осуществления фенотип включает экспрессию, например, поверхностную экспрессию, одного или нескольких поверхностных маркеров CD3, CD4, CD8 и/или рекомбинантного рецептора (например, CAR) или его суррогатного маркера, указывающего на экспрессию рекомбинантного рецептора (например, CAR) или коррелирующего с ней.

[0218] В конкретных вариантах осуществления фенотип идентифицируют по экспрессии одной или нескольких характеристических молекул, которые представляют собой поверхностные маркеры. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии CD3, CD4, CD8 и/или рекомбинантного рецептора, например, CAR. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой CAR. В конкретных вариантах осуществления фенотип включает CD3⁺/CAR⁺, CD4⁺/CAR⁺ и/или CD8⁺/CAR⁺.

[0219] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии CD27, CCR7 и/или CD45RA и/или рекомбинантного рецептора, например, CAR. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой CCR7⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой CD27⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой CD45RA⁺/CAR⁺. В определенных вариантах

осуществления фенотип представляет собой $CCR7^+/CD45RA^-/CAR^+$. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой $CD27^+/CD45RA^-/CAR^+$. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой $CCR7^+/CD27^+/CD45RA^-/CAR^+$.

[0220] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой жизнеспособность. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой наличие экспрессии маркера, который указывает, что в клетке протекают нормальные функциональные клеточные процессы и/или в ней не прошел или не проходит процесс некроза или программируемой гибели клеток. В определенных вариантах осуществления жизнеспособность можно оценивать по окислительно-восстановительному потенциалу клетки, целостности клеточной мембраны или активности или функции митохондрий. В определенных вариантах осуществления жизнеспособность представляет собой отсутствие характеристической молекулы, ассоциированной с гибелью клеток, или отсутствие в анализе показателя гибели клеток.

[0221] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает жизнеспособность клеток. В определенных вариантах осуществления жизнеспособность клеток можно детектировать, измерять и/или оценивать рядом способов, являющихся стандартными в данной области. Неограничивающие примеры таких анализов жизнеспособности в качестве неограничивающих примеров включают анализы захвата красителей (например, анализы кальцеин-АМ), анализы жизнеспособности клеток с ХТТ и анализы исключения красителей (например, анализы исключения красителей трипанового синего, эозина или пропидия). Анализы жизнеспособности пригодны для определения количества или процентного содержания (например, частоты) жизнеспособных клеток в дозе клеток, композиции клеток и/или образце клеток. В конкретных вариантах осуществления фенотип включает жизнеспособность клеток вместе с другими характеристиками, например, экспрессией рекомбинантного рецептора.

[0222] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает жизнеспособность клеток, жизнеспособные $CD3^+$ -, жизнеспособные $CD4^+$ -, жизнеспособные $CD8^+$ -, жизнеспособные $CD3^+/CAR^+$ -, жизнеспособные $CD4^+/CAR^+$ -, жизнеспособные $CD8^+/CAR^+$ -, жизнеспособные $CD4^+/CCR7^+/CAR^+$ -, жизнеспособные $CD8^+/CD27^+/CAR^+$ -, жизнеспособные $CD4^+/CD27^+/CAR^+$ -, жизнеспособные $CD8^+/CCR7^+/CD27^+/CAR^+$ -, жизнеспособные $CD4^+/CCR7^+/CD27^+/CAR^+$ -, жизнеспособные $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-/CAR^+$ - или жизнеспособные $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$ -клетки или их сочетание.

[0223] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает отсутствие апоптоза и/или показателей того, что клетка проходит процесс апоптоза. Апоптоз представляет собой процесс программируемой гибели клеток который включает ряд стандартных морфологических и биохимических событий, которые приводят к характерным изменениям и гибели клетки. Эти изменения включают

образование пузырьков, сморщивание клетки, фрагментацию ядра, конденсацию хроматина, фрагментацию хромосомной ДНК и общее разрушение иРНК. Апоптоз представляет собой хорошо охарактеризованный процесс, и характеристические молекулы, ассоциированные с разными его стадиями хорошо известны в данной области.

[0224] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие ранней стадии апоптоза и/или отсутствие показателя и/или характеристической молекулы, ассоциированных с ранней стадией апоптоза. На ранних стадиях апоптоза выявляют изменения клеточной и митохондриальной мембранах. Также выявляют биохимические изменения в цитоплазме и ядре клетки. Например, ранние стадии апоптоза можно выявлять по активации определенных каспаз, например, 2, 8, 9 и 10. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие поздней стадии апоптоза и/или отсутствие показателя и/или характеристической молекулы, ассоциированной с поздней стадией апоптоза. Стадии апоптоза от средней до поздней характеризуются дополнительной потерей целостности мембраны, конденсацией хроматина и фрагментацией ДНК и включают биохимические события, такие как активация каспаз 3, 6 и 7.

[0225] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие экспрессии одного или нескольких факторов, ассоциированных с апоптозом, включая проапоптотические факторы, которые известны как инициаторы апоптоза, например, представители пути рецепторов гибели, активированных представителей митохондриального (собственного) пути, такие как представители семейства Bcl-2, например, Bax, Bad и Bid, и каспазы. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие или малое количество маркера апоптоза. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие экспрессии маркера апоптоза. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие индикатора, например, молекулы аннексина V, которая при инкубации или контакте с композицией клеток предпочтительно связывается с клетками, проходящими апоптоз. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает экспрессию одного или нескольких маркеров, которые являются показателем апоптотического состояния в клетке.

[0226] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие (или низкую) экспрессии характеристической молекулы, которая представляет собой маркер апоптоза. Специалистам в данной области известны различные маркеры апоптоза, и в качестве неограничивающих примеров они включают увеличение активности одной или нескольких каспаз, т.е. активированную каспазу (например, активную каспазу), увеличение расщепления PARP, активацию и/или транслокацию белков семейства Bcl-2, представителей пути гибели клеток, например, Fas и FADD, наличие сморщивания ядра (например, наблюдаемое под микроскопом) и наличие фрагментации хромосомной ДНК (например, наличие лестничной фрагментации

хромосомной ДНК) или маркеры, наблюдаемые с применением анализов апоптоза, которые включает окрашивание TUNEL и окрашивание аннексином V.

[0227] Каспазы представляют собой ферменты, которые расщепляют белки поле остатка аспарагиновой кислоты, термин происходит от "цистеин-зависимых аспартат-специфичных протеаз". Каспазы участвуют в апоптозе, таким образом, активация каспаз, таких как каспаза-3, является показателем усиления или возобновления апоптоза. В определенных вариантах осуществления активацию каспаз можно детектировать известными специалистами способами. В определенных вариантах осуществления для детекции активации каспаз можно использовать антитело, которое специфически связывается с активированной каспазой (т.е., специфически связывается с расщепленным полипептидом). В другом примере, для детекции активации каспазы-3 можно использовать анализ с использованием меченого флуорохромом ингибитора активности каспаз (FLICA) посредством детекции гидролиза ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-7-амидо-4-метилкумарина (Ac-DEVD-AMC) каспазой-3 (т.е., детекции высвобождения флуоресцентного 7-амино-4-метилкумарина (AMC)). Анализы FLICA можно использовать для определения активации каспаз посредством детекции продукта субстрата, обработанного несколькими каспазами (например, FAM-VAD-FMK FLICA). Другие способы включают анализы каспаз CASPASE-GLO® (PROMEGA), в которых используют люминогенный тетрапептидный субстрат каспазы-8 (Z-LETD-аминолюциферин), тетрапептидный субстрат каспазы-9 (Z-LEHD-аминолюциферин), субстрат каспазы-3/7 (Z-DEVD-аминолюциферин), субстрат каспазы-6 (Z-VEID-аминолюциферин) или субстрат каспазы-2 (Z-VDVAD-аминолюциферин).

[0228] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает отсутствие экспрессии активированной каспазы-1, активированной каспазы-2, активированной каспазы-3, активированной каспазы-7, активированной каспазы-8, активированной каспазы-9, активированной каспазы-10 и/или активированной каспазы-13 в клетке. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает активированную каспазу 3⁺. В определенных вариантах осуществления про-форма (расщепленная зимогеном) каспазы, такая как любая из приведенных выше, также является маркером, указывающим на присутствие апоптоза. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает отсутствие или отсутствие экспрессии про-формы каспазы, такой как про-форма каспазы-3.

[0229] В определенных вариантах осуществления маркером апоптоза является расщепленная поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (PARP). Каспазы расщепляют PARP на ранних стадиях апоптоза. Таким образом, детекция расщепленного пептида PARP является маркером апоптоза. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии расщепленной PARP.

[0230] В определенных вариантах осуществления маркером апоптоза является реагент, которым в клетке детектируют признак, который ассоциирован с апоптозом. В

определенных вариантах осуществления реагент представляет собой молекулу аннексина V. На ранних стадиях апоптоза липид фосфатидилсерин (PS) транслоцируется из внутреннего в наружный слой плазматической мембраны. В норме в здоровых и/или неапоптотических клетках присутствие PS ограничено внутренней мембраной. Аннексин V представляет собой белок, который предпочтительно связывается с фосфатидилсерином (PS) с высокой аффинностью. При конъюгации с флуоресцентной меткой или другим репортером, аннексин V можно использовать для быстрой детекции этого раннего индикатора апоптоза на клеточной поверхности. В определенных вариантах осуществления присутствие PS на наружной мембране сохраняется на поздних стадиях апоптоза. Таким образом, в определенных вариантах осуществления окрашивание аннексином V является показателем ранних и поздних стадий апоптоза. В определенных вариантах осуществления аннексин, например, аннексин V, метят детектируемой меткой и инкубируют, экспонируют и/или приводят в контакт с клетками композиции клеток для детекции клеток, которые проходят апоптоз, например, посредством проточной цитометрии. В определенных вариантах осуществления флуоресцентно меченные аннексины, например, аннексин V, используют для окрашивания клеток для анализа проточной цитометрией, например, анализа с аннексином-V/7-AAD. Альтернативные протоколы, подходящие для детекции апоптоза с использованием аннексина, включают способы и анализы, в которых используют радиоактивно меченый аннексин V. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает отсутствие окрашивания аннексином, например, аннексин V⁻. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает отсутствие PS на наружной плазматической мембране. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает клетки, которые не связаны с аннексином, например, аннексином V. В определенных вариантах осуществления клетка, в которой отсутствует детектируемый PS на наружной мембране является аннексин V⁻-клеткой. В конкретных вариантах осуществления клетка, которая не связана с аннексином V⁻ в анализе, например, проточной цитометрией после инкубации с меченым аннексином V, представляет собой аннексин V⁻-клетку.

[0231] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой аннексин V⁻, аннексин V⁻ CD3⁺, аннексин V⁻CD4⁺, аннексин V⁻ CD8⁺, аннексин V⁻ CD3⁺/CAR⁺, аннексин V⁻ CD4⁺/CAR⁺, аннексин V⁻ CD8⁺/CAR⁺, активированная каспаза 3⁻, активированная каспаза 3⁻/CD3⁺, активированная каспаза 3⁻/CD4⁺, активированная каспаза 3⁻/CD8⁺, активированная каспаза 3⁻/CD3⁺/CAR⁺, активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CAR⁺, активированная каспаза 3⁻/CD8⁺/CAR⁺, аннексин V⁻/CD4⁺/CCR7⁺/CAR⁺, аннексин V⁻/CD8⁺/CD27⁺/CAR⁺, аннексин V⁻/CD4⁺/CD27⁺/CAR⁺, аннексин V⁻/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺, аннексин V⁻/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺, аннексин V⁻/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺ или аннексин V⁻/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻; активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CCR7⁺/CAR⁺, активированная каспаза 3⁻/CD8⁺/CD27⁺/CAR⁺, активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CD27⁺/CAR⁺, активированная каспаза 3⁻

/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺, активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺, активированная каспаза 3⁻/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺ или активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ или их сочетание.

[0232] В конкретных вариантах осуществления предусмотрено, что клетки, с наличием экспрессии маркера апоптоза претерпевают программируемую гибель клеток, демонстрируют сниженную иммунную функцию или ее отсутствие и обладают ограниченными возможностями, если они вообще есть, для прохождения активации, роста и/или связывания с антигеном для инициации, осуществления или вклада в иммунный ответ или активность. В конкретных вариантах осуществления фенотип определяют по отсутствию экспрессии активированной каспазы и/или отсутствию окрашивания аннексином V.

[0233] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает активированную каспазу 3⁻ (каспаза 3⁻) и/или аннексин V⁻.

[0234] В числе фенотипов находятся экспрессия или поверхностная экспрессия одного или нескольких маркеров, как правило, ассоциированных с одним или несколькими подтипами или субпопуляциями Т-клеток или их фенотипами. Подтипы и субпопуляции Т-клеток могут включать CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки и их подтипы, которые могут включать наивные Т (T_N) клетки, эффекторные Т-клетки (T_{ЭФФ}), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}), центральные Т-клетки памяти (T_{CM}), эффекторные Т-клетки памяти (T_{ЕМ}), клетки T_{ЕМRA} или конечно дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, ассоциированные со слизистой инвариантные Т-клетки (MAIT), натуральные и адаптивные регуляторные Т (Treg) клетки, хелперные Т-клетки, такие как T_H1 клетки, T_H2 клетки, T_H3 клетки, T_H17 клетки, T_H9 клетки, T_H22 клетки, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

[0235] В определенных аспектах в число фенотипов включены экспрессия, или маркеры, или функции, например, антиген-специфичные функции, такие как секреция цитокинов, которые ассоциированы с подмножеством менее дифференцированных клеток или с более дифференцированным подмножеством. В определенных вариантах осуществления фенотипы представляют собой фенотипы, ассоциированные с менее дифференцированным подмножеством, например, продукцию одного или нескольких CCR7⁺, CD27⁺ и интерлейкина-2 (IL-2). В определенных аспектах менее дифференцированные подмножества также могут быть связаны с терапевтической эффективностью, самоподдержанием, функциями жизнеспособности или реакцией "трансплантат против хозяина". В определенных вариантах осуществления фенотипы представляют собой фенотипы, ассоциированные с более дифференцированным подмножеством, например, продукцию одного или нескольких из интерферона-гамма (IFN-γ) или IL-13. В определенных аспектах более дифференцированные подмножества также могут быть связаны со старением и эффекторной функцией.

[0236] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип Т-клеток памяти или подмножества Т-клеток памяти, презентируемых распознаваемому ими антигену. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип Т-клеток памяти (или одного или нескольких маркеров, ассоциированных с ними), таких как T_{SCM} клетки, T_{EM} клетки или T_{EMRA} клетки, T_{SCM} клетки или их сочетание. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает экспрессию одной или нескольких характеристических молекул, которые являются маркерами клеток памяти и/или Т-клеток памяти или их подтипов. В определенных аспектах иллюстративные фенотипы, ассоциированные T_{SCM} клетками могут включать одно или несколько из $CD45RA^-$, $CD62L^+$, $CCR7^+$ и $CD95^+$. В определенных аспектах иллюстративные фенотипы, ассоциированные с T_{EM} клетками могут включать одно или несколько из $CD45RA^-$, $CD62L^-$, $CCR7^-$ и $CD95^+$.

[0237] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает экспрессию одной или нескольких характеристических молекул, которые являются маркерами наивных Т-клеток.

[0238] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает Т-клетки памяти или наивные Т-клетки. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой наличие или отсутствие экспрессии одной или нескольких характеристических молекул, которые являются маркерами памяти. В определенных вариантах осуществления маркер памяти представляет собой характеристическую молекулу, которую можно использовать для определения популяции Т-клеток памяти.

[0239] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип или один или несколько маркеров, ассоциированных с не являющимися клетками памяти Т-клетками или их подтипом; в определенных аспектах он представляет собой или включает фенотип или маркер(ы), ассоциированные с наивными клетками. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой $CCR7^+/CD27^+/CD28^+/CD45RA^+$. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CCR7^+/CD45RA^+$. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип центральной Т-клетки памяти. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CCR7^+/CD27^+/CD28^+/CD45RA^-$. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CCR7^-/CD27^+/CD28^+/CD45RA^-$. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип T_{EMRA} клетки или T_{SCM} клетки. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CD45RA^+$. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CCR7^-/CD27^-/CD28^-/CD45RA^+$. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает один $CD27^+/CD28^+$, $CD27^-/CD28^+$, $CD27^+/CD28^-$, или $CD27^-/CD28^-$. В определенных

вариантах осуществления фенотип представляет собой $CCR7^+/CD27^+/CD45RA^+$. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CCR7^+/CD45RA^+$. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CCR7^+/CD27^+/CD45RA^-$. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CCR7^+/CD27^+/CD45RA^-$. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CD45RA^+$. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CCR7^+/CD27^+/CD45RA^+$.

[0240] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает любое из указанных выше фенотипических свойств и дополнительно включает экспрессию рекомбинантного рецептора, например, фенотип, ассоциированный с Т-клетками памяти или подтипом Т-клеток памяти, которые экспрессируют CAR, или фенотип, ассоциированный с наивными клетками, которые экспрессируют CAR. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип центральной Т-клетки памяти или стволовой центральной Т-клетки памяти, которая экспрессирует CAR. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип эффекторной клетки памяти, которая экспрессирует CAR. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип T_{EMRA} клетки, которая экспрессирует CAR. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD28^+/CD45RA^-$; $CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD28^+/CD45RA^-$; $CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD28^-/CD45RA^+$; $CAR^+/CD27^+/CD28^+$; $CAR^+/CD27^+/CD28^-$ или $CAR^+/CD27^+/CD28^-$. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD45RA^-$; $CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD45RA^-$; $CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD28^-/CD45RA^+$; $CAR^+/CD27^+$; $CAR^+/CD27^-$; $CAR^+/CD27^+/CD28^-$ или $CAR^+/CD27^-/CD28^-$.

[0241] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип Т-клетки, которая негативна по маркеру апоптоза. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наивную клетку, которая негативна по маркеру апоптоза. В определенных вариантах осуществления маркером апоптоза является активированная каспаза 3. В определенных вариантах осуществления маркером апоптоза является наличие окрашивания аннексином V.

[0242] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип Т-клеток памяти или их подтипов, негативных по маркеру апоптоза, которые экспрессируют CAR. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип Т-клеток памяти или их конкретных подтипов, негативных по маркеру апоптоза, которые экспрессируют CAR. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип наивной клетки, негативной по маркеру апоптоза, которая экспрессирует CAR. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип

центральной Т-клетки памяти, или T_{SCM} клетки, или наивной клетки, негативных по маркеру апоптоза, которые экспрессируют CAR. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает фенотип эффекторной клетки памяти, негативной по маркеру апоптоза, которая экспрессирует CAR. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает аннексин $V^-/CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD28^+/CD45RA^-$; аннексин $V^-/CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD28^+/CD45RA^-$; аннексин $V^-/CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD28^-/CD45RA^+$; аннексин $V^-/CAR^+/CD27^+/CD28^+$; аннексин $V^-/CAR^+/CD27^-/CD28^+$; аннексин $V^-/CAR^+/CD27^+/CD28^-$ или аннексин $V^-/CAR^+/CD27^-/CD28^-$. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает активированная каспаза $3^-/CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD28^+/CD45RA^-$; активированная каспаза $3^-/CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD28^+/CD45RA^-$; активированная каспаза $3^-/CAR^+/CCR7^+/CD27^-/CD28^-/CD45RA^+$; активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^+/CD28^+$; активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^-/CD28^+$; активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^+/CD28^-$ или активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^-/CD28^-$. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает аннексин $V^-/CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD45RA^-$; аннексин $V^-/CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD45RA^-$; аннексин $V^-/CAR^+/CCR7^+/CD27^-/CD45RA^+$; аннексин $V^-/CAR^+/CD27^+/CD28^+$; аннексин $V^-/CAR^+/CD27^-/CD28^+$; аннексин $V^-/CAR^+/CD27^+$; или аннексин $V^-/CAR^+/CD27^-$. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает активированная каспаза $3^-/CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD45RA^-$; активированная каспаза $3^-/CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD45RA^-$; активированная каспаза $3^-/CAR^+/CCR7^+/CD27^-/CD45RA^+$; активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^+/CD28^+$; активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^-/CD28^+$; активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^+$ или активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^-$.

[0243] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CD27^+/CD28^+$, $CD27^-/CD28^+$, $CD27^+/CD28^-$, $CD27^-/CD28^-$ или их сочетание. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CAR^+/CD27^+/CD28^+$, $CAR^+/CD27^-/CD28^+$, $CAR^+/CD27^+/CD28^-$, $CAR^+/CD27^-/CD28^-$ или их сочетание. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^+/CD28^+$, активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^-/CD28^+$, активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^+/CD28^-$, активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^-/CD28^-$ или их сочетание. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает аннексин $V^-/CAR^+/CD27^+/CD28^+$, аннексин $V^-/CAR^+/CD27^-/CD28^+$, аннексин $V^-/CAR^+/CD27^+/CD28^-$, аннексин $V^-/CAR^+/CD27^-/CD28^-$ или их сочетание. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CD27^+$, $CD27^-$, $CD27^+$, $CD27^-$ или их сочетание. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $CAR^+/CD27^+$, $CAR^+/CD27^-$, $CAR^+/CD27^+$, $CAR^+/CD27^-$ или их сочетание. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^+$, активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^-$, активированная каспаза $3^-/CAR^+/CD27^+$,

активированная каспаза 3⁻/CAR⁺/CD27⁻ или их сочетание. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает аннексин V⁻/CAR⁺/CD27⁺, аннексин V⁻/CAR⁺/CD27⁻, аннексин V⁻/CAR⁺/CD27⁺, аннексин V⁻/CAR⁺/CD27⁻ или их сочетание.

[0244] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает CCR7⁺/CD28⁺, CCR7⁻/CD28⁺, CCR7⁺/CD28⁻, CCR7⁻/CD28⁻ или их сочетание. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает CAR⁺/CCR7⁺/CD28⁺, CAR⁺/CCR7⁻/CD28⁺, CAR⁺/CCR7⁺/CD28⁻, CAR⁺/CCR7⁻/CD28⁻ или их сочетание. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает активированная каспаза 3⁻/CAR⁺/CCR7⁺/CD28⁺, активированная каспаза 3⁻/CAR⁺/CCR7⁻/CD28⁺, активированная каспаза 3⁻/CAR⁺/CCR7⁺/CD28⁻, активированная каспаза 3⁻/CAR⁺/CCR7⁻/CD28⁻ или их сочетание. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает аннексин V⁻/CAR⁺/CCR7⁺/CD28⁺, аннексин V⁻/CAR⁺/CCR7⁻/CD28⁺, аннексин V⁻/CAR⁺/CCR7⁺/CD28⁻, аннексин V⁻/CAR⁺/CCR7⁻/CD28⁻ или их сочетание. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает CCR7⁺, CCR7⁻, CCR7⁺, CCR7⁻ или их сочетание. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает CAR⁺/CCR7⁺, CAR⁺/CCR7⁻, CAR⁺/CCR7⁺, CAR⁺/CCR7⁻ или их сочетание. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает активированная каспаза 3⁻/CAR⁺/CCR7⁺, активированная каспаза 3⁻/CAR⁺/CCR7⁻, активированная каспаза 3⁻/CAR⁺/CCR7⁺, активированная каспаза 3⁻/CAR⁺/CCR7⁻ или их сочетание. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает аннексин V⁻/CAR⁺/CCR7⁺, аннексин V⁻/CAR⁺/CCR7⁻, аннексин V⁻/CAR⁺/CCR7⁺, аннексин V⁻/CAR⁺/CCR7⁻ или их сочетание.

[0245] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии маркера истощения. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии характеристической молекулы, которая ассоциирована с истощением. В определенных вариантах осуществления характеристическая молекула представляет собой любую молекулу, ассоциированную с истощением, или характеристику, ассоциированную с истощением, например, плохая эффекторная функция или экспрессия ингибиторного рецептора. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой наличие или отсутствие экспрессии ингибитора контрольной точки иммунного ответа. В конкретных вариантах осуществления маркером истощения являются CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA или CD96 или их сочетание. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой наличие или отсутствие экспрессии CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA или CD96 или их сочетания. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой наличие или отсутствие экспрессии PD1 и/или FOXP3.

[0246] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии маркера истощения у $CD3^+$ -клетки, которая экспрессирует рекомбинантный рецептор или CAR. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии маркера истощения у $CD4^+$ -клетки, которая экспрессирует рекомбинантный рецептор или CAR. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии маркера истощения, и $CD3^+$, и наличие экспрессии рекомбинантного рецептора или CAR. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии маркера истощения у $CD4^+$ -клетки, которая экспрессирует рекомбинантный рецептор или CAR. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии маркера истощения у $CD8^+$ -клетки, которая экспрессирует рекомбинантный рецептор или CAR. В конкретных вариантах осуществления маркер истощения представляет собой одно или несколько из CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA или CD96. В конкретных вариантах осуществления маркер истощения представляет собой PD1 и/или FOXP3.

[0247] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $PD1^-/CD3^+$, $PD1^-/CD4^+$, $PD1^-/CD8^+$, $PD1^-/CD3^+/CAR^+$, $PD1^-/CD4^+/CAR^+$, $PD1^-/CD8^+/CAR^+$, $PD1^-/\text{аннексин } V^-$, $PD1^-/\text{аннексин } V^-/CD3^+$, $PD1^-/\text{аннексин } V^-/CD4^+$, $PD1^-/\text{аннексин } V^-/CD8^+$, $PD1^-/\text{аннексин } V^-/CD3^+/CAR^+$, $PD1^-/\text{аннексин } V^-/CD4^+/CAR^+$, $PD1^-/\text{аннексин } V^-/CD8^+/CAR^+$, $PD1^-/\text{активированная каспаза } 3^-$, $PD1^-/\text{активированная каспаза } 3^-/CD3^+$, $PD1^-/\text{активированная каспаза } 3^-/CD4^+$, $PD1^-/\text{активированная каспаза } 3^-/CD8^+$, $PD1^-/\text{активированная каспаза } 3^-/CD3^+/CAR^+$, $PD1^-/\text{активированная каспаза } 3^-/CD4^+/CAR^+$, $PD1^-/\text{активированная каспаза } 3^-/CD8^+/CAR^+$ или их сочетание.

[0248] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает $FOXP3^-/CD3^+$, $FOXP3^-/CD4^+$, $FOXP3^-/CD8^+$, $FOXP3^-/CD3^+/CAR^+$, $FOXP3^-/CD4^+/CAR^+$, $FOXP3^-/CD8^+/CAR^+$, $FOXP3^-/\text{аннексин } V^-$, $FOXP3^-/\text{аннексин } V^-/CD3^+$, $FOXP3^-/\text{аннексин } V^-/CD4^+$, $FOXP3^-/\text{аннексин } V^-/CD8^+$, $FOXP3^-/\text{аннексин } V^-/CD3^+/CAR^+$, $FOXP3^-/\text{аннексин } V^-/CD4^+/CAR^+$, $FOXP3^-/\text{аннексин } V^-/CD8^+/CAR^+$, $FOXP3^-/\text{активированная каспаза } 3^-$, $FOXP3^-/\text{активированная каспаза } 3^-/CD3^+$, $FOXP3^-/\text{активированная каспаза } 3^-/CD4^+$, $FOXP3^-/\text{активированная каспаза } 3^-/CD8^+$, $FOXP3^-/\text{активированная каспаза } 3^-/CD3^+/CAR^+$, $FOXP3^-/\text{активированная каспаза } 3^-/CD4^+/CAR^+$, $FOXP3^-/\text{активированная каспаза } 3^-/CD8^+/CAR^+$ или их сочетание.

[0249] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие экспрессии характеристической молекулы, которая ассоциирована с активацией Т-клеток. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает отсутствие экспрессии одной или нескольких характеристических молекул, которые представляют собой маркер активации. Как правило, активация Т-клеток требует двух одновременных сигналов. Первый представляет собой связывание комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) с молекулой главного комплекса гистосовместимости

(МНС), несущей пептидный антиген. Второй представляет собой связывание костимулирующего рецептора CD28 с белками на поверхности APC, такими как B7-2 или B7-1. В определенных вариантах осуществления характеристическая молекула ассоциирована с активацией TCR, например, активируется, изменяется или экспрессируется в результате активации Т-клеток. В определенных вариантах осуществления характеристическая молекула ассоциирована с активацией рецептора CD28, например, молекулы, которая активируется, изменяется или экспрессируется в результате активации Т-клеток.

[0250] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает отсутствие экспрессии одной или нескольких характеристических молекул, которые представляют собой маркер активации. В определенных вариантах осуществления маркер активации представляет собой один или несколько из CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3, Ki67 или их сочетание. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие или наличие экспрессии одного или нескольких из CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3 или Ki67. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает экспрессию CD25, CD127, LAG3, Ki67 или их сочетания.

[0251] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии маркера активации у CD3⁺-клетки, которая экспрессирует рекомбинантный рецептор или CAR. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии маркера активации у CD4⁺-клетки, которая экспрессирует рекомбинантный рецептор или CAR. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии маркера активации у CD8⁺-клетки, которая экспрессирует рекомбинантный рецептор или CAR. В конкретных вариантах осуществления маркер активации представляет собой один или несколько из CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3 или Ki67. В конкретных вариантах осуществления маркер активации представляет собой CD25, CD127, LAG3, Ki67 или их сочетание.

[0252] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает наличие или отсутствие экспрессии маркера активации и CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺/CAR⁺, CD4⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺, аннексин V⁻, аннексин V⁻/CD3⁺, аннексин V⁻/CD4⁺, аннексин V⁻/CD8⁺, аннексин V⁻/CD3⁺/CAR⁺, аннексин V⁻/CD4⁺/CAR⁺, аннексин V⁻/CD8⁺/CAR⁺, активированная каспаза 3⁻, активированная каспаза 3⁻/CD3⁺, активированная каспаза 3⁻/CD4⁺, активированная каспаза 3⁻/CD8⁺, активированная каспаза 3⁻/CD3⁺/CAR⁺, активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CAR⁺, активированная каспаза 3⁻/CD8⁺/CAR⁺ или их сочетание.

[0253] В определенных вариантах осуществления фенотип оценивают по ответу на стимул, например, стимул, который инициирует, индуцирует, стимулирует или

продолжает функцию иммунных клеток. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют в стимулирующих условиях или со стимулирующим средством, фенотип представляет собой или включает ответ на стимуляцию. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию или секрецию растворимого фактора в ответ на одну или несколько стимуляций. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает отсутствие или продукция или секреция растворимого фактора в ответ на одну или несколько стимуляций. В определенных вариантах осуществления растворимый фактор представляет собой цитокин. В определенных вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-2. В определенных вариантах осуществления цитокин представляет собой TNF α .

[0254] Условия могут включать одно или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, определенных средств, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие средства, предназначенные для активации клеток. В определенных вариантах осуществления проводят стимуляцию клеток, и фенотип определяют по тому происходит ли продукция или секреция растворимого фактора, например, цитокина или хемокина. В определенных вариантах осуществления стимуляция является неспецифической, т.е., не является стимуляцией специфичным антигеном. В определенных вариантах осуществления стимуляция включает РМА и иономицин. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют в стимулирующих условиях или со стимулирующим средством в течение приблизительно 1 часа, приблизительно 2 часов, приблизительно 3 часов, приблизительно 4 часов, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 24 часов, приблизительно 48 часов или в течение периода времени от 1 часа до 4 часов, от 1 часа до 12 часов, от 12 часов до 24 часов или в течение периода более 24 часов.

[0255] В определенных вариантах осуществления клетки стимулируют средством, которое является антигеном или его эпитопом, который специфичен к рекомбинантному рецептору, или является антителом или его фрагментом, которые связывают и/или распознают рекомбинантный рецептор, или их сочетание. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой CAR, а средство представляет собой антиген или его эпитоп, который специфичен к CAR, или представляет собой антитело или его фрагмент, которые связывают и/или распознают CAR, или их сочетание. В конкретных вариантах осуществления клетки стимулируют посредством инкубации клеток в присутствии клетки-мишени с поверхностной экспрессией антигена, распознаваемого CAR. В определенных вариантах осуществления

рекомбинантный рецептор представляет собой CAR, а средство представляет собой антитело или его активные фрагмент, вариант или часть, которые связываются с CAR. В определенных вариантах осуществления антитело или его активные фрагмент, вариант или часть, которые связываются с CAR, представляют собой антитело к идиотипу (анти-ID).

[0256] В определенных вариантах осуществления стимулирующие условия или средства включают одно или несколько средство, например, лиганд, способный к стимуляции или активации домена внутриклеточной сигнализации комплекса TCR. В определенных аспектах средство запускает или инициирует каскад внутриклеточной передачи сигнала TCR/CD3 в Т-клетке. Такие средства могут включать антитела, такие как антитела, специфичные к компоненту TCR и/или костимулирующему рецептору, например, антитела к CD3, антитела к CD28, например, связанные с твердой подложкой, такой как гранула, и/или один или несколько цитокинов. В определенных вариантах осуществления одно или несколько средств представляют собой РМА и иономицин.

[0257] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию или секрецию цитокина в ответ на одну или несколько стимуляций. Продукция и/или секреция цитокинов вносит вклад в иммунный ответ и участвует в различных процессах, включающих индукцию противовирусных белков и индукцию пролиферации Т-клеток. Цитокины не являются заранее сформированными факторами, но быстро продуцируются и секретируются в ответ на активацию клеток. Продукцию или секрецию цитокинов можно измерять, детектировать и/или количественно определять любым подходящим способом, известным в данной области.

[0258] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой продукцию одного или нескольких цитокинов. В определенных вариантах осуществления продукция двух или более цитокинов из одной и той же клетки может свидетельствовать о полифункциональных характеристиках таких клеток. В конкретных вариантах осуществления продукцию одного или нескольких цитокинов измеряют, детектируют и/или количественно определяют посредством внутриклеточного окрашивания цитокинов. Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) посредством проточной цитометрии представляет собой способ, хорошо подходящий для исследования продукции цитокинов на уровне одной клетки. Им детектируют продукцию и накопление цитокинов в эндоплазматическом ретикулуме после стимуляции клеток, обеспечивая идентификацию популяций клеток, с наличием или отсутствием продукции конкретного цитокина или разделение высокопродуцирующих и низкопродуцирующих клеток на основе порогового значения. В определенных вариантах осуществления, как описано выше, стимуляцию можно проводить с использованием неспецифической стимуляции, например, она не является стимуляцией специфичным антигеном. Например, для неспецифической стимуляции клеток можно использовать РМА/иономицин. В определенных вариантах осуществления стимуляцию можно проводить средством, которое является антигеном или его эпитопом, которые специфичны к рекомбинантному рецептору (например, CAR), или

является антителом или его фрагментом, которые связывают и/или распознают рекомбинантный рецептор, или их сочетанием. ICS также можно использовать в комбинации с другими протоколами проточной цитометрии для иммунофенотипирования с использованием поверхностных клеточных маркеров или с мультимерами МНС для оценки продукции цитокинов в конкретной подгруппе клеток, что делает его крайне гибким и универсальным способом. Другие способы на уровне единичных клеток для измерения или детекции продукции цитокинов в качестве неограничивающих примеров включают ELISPOT, лимитирующее разведение и клонирование Т-клеток.

[0259] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой продукцию цитокина, например, после стимуляции рекомбинантного рецептора антигеном, специфичным к рекомбинантному рецептору и/или распознаваемому им. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой дефицит продукции цитокина, например, после стимуляции рекомбинантного рецептора антигеном, специфичным к рекомбинантному рецептору и/или распознаваемому им. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой наличие или высокий уровень продукции цитокина. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие или низкий уровень продукции цитокина. Цитокины в качестве неограничивающих примеров могут включать интерлейкин-1 (IL-1), IL-1 β , IL-2, sIL-2Ra, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL 27, IL-33, IL-35, TNF, фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), CXCL2, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL24, PGD2, LTB4, интерферон гамма (IFN- γ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), воспалительный белок макрофагов (MIP)-1 α , MIP-1 β , Flt-3L, фракталкин и/или IL-5. В определенных вариантах осуществления фенотип включает продукцию цитокинов, например, цитокинов, ассоциированных с конкретными типами клеток, таких как цитокины, ассоциированные с подтипами Th1, Th2, Th17 и/или Treg. В определенных вариантах осуществления иллюстративные связанные с Th1 цитокины включают IL-2, IFN- γ и трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), и в определенных случаях они вовлечены в клеточный иммунный ответ. В определенных вариантах осуществления иллюстративные связанные с Th2 цитокины включают IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13, и в определенных случаях они ассоциированы с гуморальным иммунитетом и противовоспалительными свойствами. В определенных вариантах осуществления иллюстративные связанные с Th17 цитокины включают IL-17A и IL-17F, и в определенных случаях они вовлечены в привлечение нейтрофилов и макрофагов, например, при воспалительной реакции.

[0260] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию цитокина. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию более одного цитокина (например, полифункциональную). В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит продукции одного или нескольких цитокинов. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает

продукцию или ее отсутствие, одного или нескольких из IL-2, IL-5, IL-13, IFN-гамма или TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию или ее отсутствие одного или нескольких из IL-2, IL-13, IFN-гамма или TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой продукцию и/или высокий уровень продукции цитокина. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой низкую, сниженную или отсутствующую продукцию цитокина.

[0261] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает внутреннюю (внутриклеточную) продукцию цитокина, например, как оценивают в присутствии стимулирующего средства или в стимулирующих условиях, когда секрецию предотвращают или ингибируют. В определенных вариантах осуществления стимулирующее средство представляет собой неспецифическое стимулирующее средство, например, стимулирующее средство, которое не связывается с антигенсвязывающим доменом, например, на рекомбинантном рецепторе (например, CAR). В определенных вариантах осуществления стимулирующее средство представляет собой РМА/иономицин, которые могут действовать как неспецифическое стимулирующее средство. В определенных вариантах осуществления стимулирующее средство представляет собой специфичное стимулирующее средство, например, представляет собой стимулирующее средство, которое является антигеном или его эпитопом, которые специфичны к рекомбинантному рецептору (например, CAR), или представляет собой антитело или его фрагмент, которые связывают и/или распознают рекомбинантный рецептор, или их сочетание. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит или отсутствие внутренней продукции цитокина. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает внутреннее количество одного или нескольких цитокинов, когда продукцию более одного цитокина оценивают в анализе ICS. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает внутреннее количество одного или нескольких из IL-2, IL-5, IL-13, IFN-гамма или TNF-альфа, как оценивают в анализе ICS. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает низкое внутреннее количество или дефицит детектируемого количества одного или нескольких цитокинов, как оценивают в анализе ICS. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает низкое внутреннее количество или дефицит детектируемого количества IL-2, IL-5, IL-13, IFN-гамма или TNF-альфа, как оценивают в анализе ICS. В определенных вариантах осуществления фенотип включает оценку нескольких цитокинов, например, посредством мультиплексированных анализов или анализов для оценки полифункциональности (см., например, Xue et al., (2017) *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 5:85). В определенных вариантах осуществления дефицит экспрессии цитокинов обратно коррелирует ассоциирован с активностью и/или функцией клеток и/или длительностью ответа и продолжительностью жизни без прогрессирования. В определенных вариантах осуществления клетки со сниженной, минимальной или

отсутствующей продукцией цитокинов, оцениваемой любым известным способом или способом, описываемым в настоящем документе, в композиции клеток (например, выходящей композиции, терапевтической композиции клеток), находятся в сниженном количестве.

[0262] В конкретных вариантах осуществления предусмотрено, что фенотип может включать продукцию цитокина или дефицит продукции цитокина или продукцию цитокина в низком количестве. Это может зависеть от нескольких факторов, которые в качестве неограничивающих примеров включают характеристики цитокина, анализ, проводимый для детекции цитокина, и стимулирующее средство или условие, используемые в анализе. Например, в определенных вариантах осуществления предусмотрено, что фенотип представляет собой или включает дефицит или низкий уровень продукции IL-13 по показаниям ICS, тогда как в определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IFN-гамма по показаниям ICS.

[0263] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию одного или нескольких цитокинов и любого из CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺/CAR⁺, CD4⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺, аннексина V⁻, аннексина V⁻ CD3⁺, аннексина V⁻ CD4⁺, аннексина V⁻ CD8⁺, аннексина V⁻CD3⁺/CAR⁺, аннексина V⁻ CD4⁺/CAR⁺, аннексина V⁻ CD8⁺/CAR⁺, активированной каспазы 3⁻, активированной каспазы 3⁻/CD3⁺, активированной каспазы 3⁻/CD4⁺, активированной каспазы 3⁻/CD8⁺, активированной каспазы 3⁻/CD3⁺/CAR⁺, активированной каспазы 3⁻/CD4⁺/CAR⁺ или активированной каспазы 3⁻/CD8⁺/CAR⁺ или их сочетания. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию одного или нескольких цитокинов в CD4⁺/CAR⁺- и/или CD8⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой IL-2, IFN-гамма и/или TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IL-2 в CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию TNF-альфа в CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IL-2 и TNF-альфа в CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IL-2 и IFN-гамма в CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию TNF-альфа в CD8⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IFN-гамма и TNF-альфа в CD8⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IL-2 в активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию TNF-альфа в активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IL-2 и TNF-альфа в активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CAR⁺-клетках.

В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IL-2 и IFN-гамма в активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию TNF-альфа в активированная каспаза 3⁻/CD8⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IFN-гамма и TNF-альфа в активированная каспаза 3⁻/CD8⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию TNF-альфа в аннексин V⁻/CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IL-2 и TNF-альфа в аннексин V⁻/CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IL-2 и IFN-гамма в аннексин V⁻/CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию TNF-альфа в аннексин V⁻/CD8⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IFN-гамма и TNF-альфа в аннексин V⁻/CD8⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотипы, описанные в этом абзаце, прямо коррелируют с длительным ответом и продолжительностью жизни без прогрессирования. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в композиции клеток (например, выходящей композиции, терапевтической композиции клеток) содержание клеток, включающих эти фенотипы, максимизировано или увеличено. В определенных вариантах осуществления композиция клеток содержит по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток, таких как подвергнутые инженерии CD4 Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор (например, CAR) в композиции, которые способны к продукции цитокина, выбранного из интерлейкина 2 (IL-2) и/или TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления композиция клеток содержит по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток, таких как подвергнутые инженерии CD4 Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор (например, CAR), в композиции, полифункциональной по продукции двух или более цитокинов, выбранных из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа.

[0264] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит продукции одного или нескольких цитокинов. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит продукции одного или нескольких цитокинов и CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺/CAR⁺, CD4⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺, аннексина V⁻, аннексина V⁻ CD3⁺, аннексина V⁻CD4⁺, аннексина V⁻ CD8⁺, аннексина V⁻CD3⁺/CAR⁺, аннексина V⁻ CD4⁺/CAR⁺, аннексина V⁻ CD8⁺/CAR⁺, активированной каспазы 3⁻, активированной каспазы 3⁻/CD3⁺, активированной каспазы 3⁻/CD4⁺, активированной каспазы 3⁻/CD8⁺, активированной каспазы 3⁻/CD3⁺/CAR⁺, активированной каспазы 3⁻/CD4⁺/CAR⁺ или активированной каспазы 3⁻/CD8⁺/CAR⁺ или их

сочетания. В определенных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой IL-2, IFN-гамма и/или TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит продукции IL-2 в активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит продукции TNF-альфа в активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит продукции IL-2 и TNF-альфа в активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит продукции IL-2 и IFN-гамма в активированная каспаза 3⁻/CD4⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит продукции TNF-альфа в активированная каспаза 3⁻/CD8⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит продукции IFN-гамма и TNF-альфа в активированная каспаза 3⁻/CD8⁺/CAR⁺-клетках. В определенных вариантах осуществления фенотипы, описанные в этом абзаце, обратно коррелируют с длительным ответом и продолжительностью жизни без прогрессирования. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в композиции клеток (например, выходящей композиции, терапевтической композиции клеток) содержание клеток, включающих эти фенотипы, минимизировано или снижено. Например, в определенных вариантах осуществления клетки, включающие фенотип из этого абзаца составляют менее 2%, 5%, 10%, 15%, 20% или 25% всех клеток в композиции клеток (например, выходящей композиции, терапевтической композиции клеток).

[0265] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает присутствие или отсутствие внутреннего количества одного или нескольких из IL-2, IL-13, IFN-гамма или TNF-альфа, как оценивают в анализе ICS, и одного или нескольких специфических маркеров подмножества клеток или клеток конкретного типа клеток. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию или ее отсутствие одного или нескольких из IL-2, IL-13, IFN-гамма или TNF-альфа и CD4⁺/CAR⁺ и/или CD8⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IL-2 и CD4⁺/CAR⁺ и/или CD8⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит или низкую продукцию IL-2 и CD4⁺/CAR⁺ и/или CD8⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IL-13 и CD4⁺/CAR⁺ и/или CD8⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IL-13 и CD4⁺/CAR⁺ и/или CD8⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит или низкую продукцию IL-13 и CD4⁺/CAR⁺ и/или CD8⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию IFN-гамма и CD4⁺/CAR⁺ и/или CD8⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает продукцию TNF-альфа и

CD4⁺/CAR⁺ и/или CD8⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит или низкую продукцию TNF-альфа и CD4⁺/CAR⁺ и/или CD8⁺/CAR⁺.

[0266] Предоставляемыми способами можно оценивать или определять любой один или несколько фенотипов, отдельно или в комбинации. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой CD3⁺, CD3⁺/CAR⁺, CD4⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ или их сочетание.

[0267] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает CD3⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает CD3⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает CD8⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает CD4⁺/CAR⁺.

[0268] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает аннексин⁻/CD3⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает аннексин⁻/CD4⁺/CAR⁺. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой аннексин⁻/CD8⁺/CAR.

[0269] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает дефицит или низкое количество внутриклеточных IL-2 и CD4⁺/CAR⁺. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой дефицит или низкое количество внутриклеточных IL-13 и CD4⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой дефицит или низкий уровень внутриклеточной экспрессии IL-13 и CD8⁺/CAR⁺-клеток. В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой дефицит или низкое количество внутриклеточных TNF-альфа CD4⁺/CAR⁺.

[0270] В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает CD8⁺/CAR⁺. В определенных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает аннексин⁻/CD8⁺/CAR⁺.

[0271] В определенных вариантах осуществления фенотип включает индикатор продукции одного или комбинации цитокинов, необязательно неспецифически для антигена или рекомбинантного рецептора и/или которые продуцированы поликлонально, где один или несколько цитокинов представляют собой IL-2, IL-13, IL-17, IFN-гамма или TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления индикатор продукции определяют посредством анализа, необязательно посредством анализа внутриклеточного окрашивания цитокинов, включающего инкубацию образца композиции Т-клеток с поликлональным средством, антиген-специфичным средством или средством, которое связывает рекомбинантный рецептор, необязательно CAR. В определенных вариантах осуществления средство представляет собой или содержит РМА и иономицин или представляет собой или содержит Т-клеточный рецептор или агонист комплекса Т-клеточного рецептора. В определенных вариантах осуществления фенотип включает отсутствие экспрессии маркера активации, где маркер активации выбран из CD25, CD127,

LAG3, Ki67 и их сочетания. В определенных вариантах осуществления фенотип включает отсутствие экспрессии маркера истощения, где маркер истощения представляет собой продукты генов PD1 или FOXP3 или их сочетание. В определенных вариантах осуществления фенотип включает фенотип наивных клеток или фенотип клеток памяти, необязательно, где фенотип клеток памяти включает фенотип эффекторных Т-клеток памяти, фенотип центральных Т-клеток памяти или фенотип эффекторных Т-клеток памяти, экспрессирующих CD45RA (Temra).

[0272] В определенных вариантах осуществления зависимость от рекомбинантного рецептора (например, CAR) активность представляет собой меру продукции или накопления провоспалительного цитокина, необязательно, одного или комбинации TNF-альфа, IFN-гамма и IL-2. В определенных вариантах осуществления а эталонной мерой является среднее из измерений множества, необязательно по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, эталонных композиций терапевтических Т-клеток, содержащих рекомбинантный рецептор (например, CAR), где: (i) для каждой из эталонных композиций терапевтических Т-клеток наблюдали или определяли, что она после введения индивидууму обеспечивает приемлемый профиль безопасности, необязательно, когда у индивидуума присутствует заболевание или патологическое состояние, с экспрессией антигена или ассоциированное с ним; и/или (ii) для каждой из эталонных композиций терапевтических Т-клеток наблюдали или определяли, что она после введения индивидууму обеспечивает требуемую эффективность, необязательно, когда у индивидуума присутствует заболевание или патологическое состояние, с экспрессией антигена или ассоциированное с ним.

[0273] В определенных вариантах осуществления определяют, измеряют, получают, детектируют, наблюдают и/или идентифицируют определенное количество, множество или фракцию клеток конкретного фенотипа в композиции клеток. В определенных вариантах осуществления композиция клеток представляет собой композицию Т-клеток. В определенных вариантах осуществления композиция клеток содержит клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, CAR. В конкретных вариантах осуществления композиция клеток представляет собой композицию терапевтических Т-клеток, содержащую клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, которую можно вводить индивидууму для лечения заболевания или патологического состояния. В определенных вариантах осуществления количество клеток определенного фенотипа представляет собой общее количество клеток этого фенотипа в композиции клеток. В определенных вариантах осуществления количество клеток определенного фенотипа представляет собой общее количество клеток этого фенотипа, присутствующее в дозе композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления количество клеток определенного фенотипа представляет собой количество клеток этого фенотипа, присутствующее в образце композиции клеток. В определенных вариантах осуществления количество клеток определенного фенотипа

можно выразить как частоту, отношение и/или процент клеток этого фенотипа, находящихся в композиции клеток или их дозе или образце.

[0274] В конкретных вариантах осуществления определенное количество, множество или фракцию клеток определенного фенотипа преобразуют, например, для сжатия диапазона релевантных значений количества, множества или фракции. В определенных вариантах осуществления преобразование представляет собой любое применение однозначной математической функции к каждой точке во множестве данных, например, каждую точку данных x заменяют преобразованным значением $y=f(x)$, где f представляет собой определенную функцию. Как правило, преобразования можно применять для того, чтобы данные выглядели более соответствующими предположениям способа статистического анализа, который необходимо применять, или для улучшения интерпретации или внешнего вида диаграмм. В большинстве случаев функция, которую используют для преобразования данных, является обратимой и, как правило, является непрерывной. Как правило, преобразование применяют для набора сравнимых измерений. Примеры подходящих преобразований в качестве неограничивающих примеров включают логарифмическое и квадратическое преобразования, обратные преобразования и степенные преобразования. В определенных вариантах осуществления количество, множество или фракцию клеток определенного фенотипа преобразуют посредством логарифмического преобразования. В определенных вариантах осуществления логарифмическое преобразование представляет собой десятичный логарифм ($\log_{10}(x)$), натуральный логарифм ($\ln(x)$) или двоичный логарифм ($\log_2(x)$).

В. Определение дозы и введение

[0275] Терапевтическая композиция или ее доза в определенных вариантах осуществления содержит клетки в количествах, эффективных для лечения или предотвращения заболевания или патологического состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. В определенных вариантах осуществления композиция содержит клетки в количестве, эффективном для снижения тяжести заболевания или патологического состояния. В определенных вариантах осуществления композиция содержит клетки в количестве, которое обеспечивает более стабильный исход, например, исходы в виде ответа и/или безопасности, в группе индивидуумов, которым вводят композицию, и/или более стабильные фармакокинетические параметры. В определенных вариантах осуществления композиция содержит клетки в количестве, эффективном для обеспечения длительных ответа и/или продолжительности жизни без прогрессирования. В определенных аспектах предоставляемые способы включают оценку терапевтической композиции, содержащей Т-клетки, на фенотипы клеток и определение дозы на основе таких исходов.

[0276] В определенных вариантах осуществления дозу определяют так, чтобы она содержала относительно стабильное количество, долу, отношение и/или процент подвергнутых инженерии клеток с конкретным фенотипом в одной или нескольких конкретных композициях. В определенных аспектах стабильность ассоциирована или

связана с относительно стабильными активностью, функцией, фармакокинетическими параметрами, токсикологическим исходом и/или исходом в виде ответа. В определенных аспектах у множества индивидуумов композиции и/или дозы количества, доля, отношение и/или процентное содержание являются относительно стабильными, например, количество или отношение клеток с конкретным фенотипом, например, экспрессируют CCR7 (CCR7⁺) или, которые продуцируют цитокин, например, продуцируют IL-2, TNF-альфа или IFN-гамма, в композиции или стандартной дозе, варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%. В определенных аспектах количество или отношение клеток с конкретным фенотипом, например, экспрессируют CCR7 (CCR7⁺), в композиции или стандартной дозе, варьирует не более чем на 20%, или не более чем на 10%, или не более чем на 5% от среднего из указанного количества или отношения во множестве композиций Т-клеток, получаемых указанным способом, и/или варьирует от такого среднего не более чем на одно стандартное отклонение, или варьирует не более чем на 20%, или не более чем на 10%, или не более чем на 5% во множестве определенных композиций Т-клеток или доз. В определенных вариантах осуществления множество индивидуумов включает по меньшей мере 10 индивидуумов, например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100 или более индивидуумов.

[0277] В определенных аспектах дозу, например, одну или несколько стандартных доз, определяют на основе количества, процентного содержания, отношения, частоты и/или доли конкретного подмножества подвергнутых инженерии Т-клеток, например, клеток с конкретным фенотипом, таким как фенотип с конкретным поверхностным маркером. В определенных аспектах фенотип клеток определяют на основе экспрессии и/или отсутствия экспрессии конкретных клеточных маркеров, например, поверхностных маркеров. В определенных аспектах клеточные маркеры включает маркеры, указывающие на жизнеспособность и/или апоптотическое состояние клеток. В определенных аспектах иллюстративные маркеры включают CD3, CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA, аннексин V или активированную каспазу 3. В определенных аспектах иллюстративный маркер представляет собой CCR7. В определенных аспектах иллюстративный маркер представляет собой CD27. В определенных аспектах иллюстративные маркеры включают CCR7 и/или CD27. В определенных аспектах иллюстративные маркеры включают CCR7, CD27 и/или CD45RA.

[0278] В определенных вариантах осуществления предоставлены способы, включающие введение индивидууму одной или нескольких стандартных доз композиции терапевтических Т-клеток, таких как любая из описываемых в настоящем документе, и/или любая стандартная доза, определенная способами, предоставленными в настоящем документе.

[0279] В определенных вариантах осуществления предоставлены способы, включающие введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием стандартной дозы композиции Т-клеток, содержащих клетки, несущие рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или патологическим состоянием, где вводят определенное количество всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) клеток терапевтической композиции, всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺-клеток (рецептор⁺/CD8⁺) и/или вводят стандартную дозу таких клеток, где стандартная доза содержит определенное количество, процент, отношение, частоту и/или долю клеток с определенным фенотипом, например, CCR7⁺/CD4⁺, CCR7⁺/CD8⁺, CD27⁺/CD4⁺, CD27⁺/CD8⁺, CD45RA⁺/CD4⁺, CD45RA⁺/CD8⁺, CCR7⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD8⁺, CD27⁻/CD4⁺, CD27⁻/CD8⁺, CD45RA⁻/CD4⁺, CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁺/CD27⁺/CD4⁺, CCR7⁺/CD27⁺/CD8⁺, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD4⁺, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁻/CD27⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD27⁻/CD8⁺.

[0280] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CCR7⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество CD4⁺/CCR7⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CD27 и/или CD45RA на клетках.

[0281] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество CD4⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления определенное

количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CCR7 и/или CD45RA на клетках.

[0282] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное количество CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CD45RA на клетках.

[0283] В определенных вариантах осуществления количество клеток в стандартной дозе представляет собой количество клеток или количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор или экспрессирующих CAR клеток, или количество, процентное содержание, отношение, частоту и/или долю таких клеток определенного фенотипа, например, клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют один или несколько маркеров, выбранных из CD3 CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA, аннексина V, или активированной каспазы 3, которые необходимо вводить конкретному индивидууму в определенной дозе, например, индивидууму у которого получены клетки. В определенных вариантах осуществления количество клеток в стандартной дозе представляет собой количество клеток или количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор или экспрессирующих CAR клеток, или количество, процентное содержание, отношение, частоту и/или долю таких клеток определенного фенотипа, например, CCR7⁺, CD27⁺, CD45RA⁺, CD45RA⁻, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺, негативных по маркеру апоптоза (например, аннексин V⁻ или каспаза 3⁻) клеток, или клеток, которые позитивны или негативны по одному или нескольким из любых, указанных выше.

[0284] В определенных вариантах осуществления количество клеток в стандартной дозе представляет собой количество клеток или количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор или экспрессирующих CAR клеток, или количество, процентное содержание, отношение и/или долю таких клеток определенного фенотипа, например, CCR7⁺/CD4⁺, CCR7⁺/CD8⁺, CD27⁺/CD4⁺, CD27⁺/CD8⁺, CD45RA⁺/CD4⁺, CD45RA⁺/CD8⁺, CCR7⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD8⁺, CD27⁻/CD4⁺, CD27⁻/CD8⁺, CD45RA⁻/CD4⁺, CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁺/CD27⁺/CD4⁺, CCR7⁺/CD27⁺/CD8⁺, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD4⁺, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁻/CD27⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD27⁻/CD8⁺ и негативных по маркеру апоптоза (например, аннексин V⁻ или каспаза

3⁻) клеток, которые необходимо вводить конкретному индивидууму в определенной дозе, например, индивидууму, у которого получены клетки. В определенных вариантах осуществления стандартная доза содержит определенное количество клеток или количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор или экспрессирующих CAR клеток, или количество, процентное содержание, отношение и/или долю таких клеток определенного фенотипа например, CCR7⁺/CD4⁺, CCR7⁺/CD8⁺, CD27⁺/CD4⁺, CD27⁺/CD8⁺, CD45RA⁺/CD4⁺, CD45RA⁺/CD8⁺, CCR7⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD8⁺, CD27⁻/CD4⁺, CD27⁻/CD8⁺, CD45RA⁻/CD4⁺, CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁺/CD27⁺/CD4⁺, CCR7⁺/CD27⁺/CD8⁺, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD4⁺, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁻/CD27⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD27⁻/CD8⁺ и негативных по маркеру апоптоза (например, аннексин V⁻ или каспаза 3⁻) клеток и/или любое их подмножество.

[0285] В определенных вариантах осуществления стандартную дозу определяют на основе количества клеток или типа клеток и/или частоты, отношения, и/или процентного содержания клеток или типов клеток, например, отдельных популяций, фенотипов или подтипов, в композиции клеток, например, клеток с фенотипами аннексин V⁻/CCR7⁺/CAR⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CAR⁺/CD4⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CAR⁺/CD8⁺; аннексин V⁻/CD27⁺/CAR⁺; аннексин V⁻/CD27⁺/CAR⁺/CD4⁺; аннексин V⁻/CD27⁺/CAR⁺/CD8⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺/CD4⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺/CD8⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺/CD4⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺/CD8⁺; аннексин V⁻/CCR7⁻/CD45RA⁻/CAR⁺; аннексин V⁻/CCR7⁻/CD45RA⁻/CAR⁺/CD4⁺; аннексин V⁻/CCR7⁻/CD45RA⁻/CAR⁺/CD8⁺; аннексин V⁻/CCR7⁻/CD27⁻/CAR⁺; аннексин V⁻/CCR7⁻/CD27⁻/CAR⁺/CD4⁺; аннексин V⁻/CCR7⁻/CD27⁻/CAR⁺/CD8⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CAR⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CAR⁺/CD4⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CAR⁺/CD8⁺; активированная каспаза 3⁻/CD27⁺/CAR⁺; активированная каспаза 3⁻/CD27⁺/CAR⁺/CD4⁺; активированная каспаза 3⁻/CD27⁺/CAR⁺/CD8⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺/CD4⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺/CD8⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺/CD4⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺/CD8⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁻/CD45RA⁻/CAR⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁻/CD45RA⁻/CAR⁺/CD4⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁻/CD45RA⁻/CAR⁺/CD8⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁻/CD27⁻/CAR⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁻/CD27⁻/CAR⁺/CD4⁺; и/или активированная каспаза 3⁻/CCR7⁻/CD27⁻/CAR⁺/CD8⁺ или их сочетанием.

[0286] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки),

или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

[0291] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 5×10^7 , точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит по меньшей мере или по меньшей мере или приблизительно 5×10^7 , 1×10^7 , 5×10^6 , 1×10^6 , или по меньшей мере или приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

[0292] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит по меньшей мере или приблизительно 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере или приблизительно 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

[0293] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

[0294] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

[0295] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит не более чем точно или приблизительно 1×10^8 , не более чем точно или приблизительно 5×10^7 , не более чем точно или приблизительно 1×10^7 , не более чем точно или приблизительно 5×10^6 , не более чем точно или приблизительно 1×10^6 , или не более чем точно или приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

[0296] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

[0297] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 , точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD3⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD3⁺-клетки), или всех CD3⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит не более чем точно или приблизительно 5×10^8 , не более чем точно или приблизительно 1×10^8 , не более чем точно или приблизительно 5×10^7 , не более чем точно или приблизительно 1×10^7 , не более чем точно или приблизительно 5×10^6 , не более чем точно или приблизительно 1×10^6 , или не более чем точно или приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD3⁺-клеток или всех CD3⁺-клеток.

[0298] В определенных вариантах осуществления общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые являются живыми или жизнеспособными. В определенных вариантах осуществления общее количество CD3⁺-клеток, общее

количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, и/или представляет собой общее количество таких клеток, которые негативны (-) по маркерам апоптоза, где маркеры апоптоза представляют собой аннексин V или активированную каспазу 3.

[0299] В определенных вариантах осуществления в любой из композиций, содержащих Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, предоставленный в настоящем документе, по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции (или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор) позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности.

[0300] В определенных вариантах осуществления в любой из композиций, содержащих Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, предоставленный в настоящем документе, по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции (или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор) способны к продукции цитокина, выбранного из интерлейкина 2 (IL-2) и/или TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления Т-клетка, способная к продукции IL-2 и/или TNF-альфа, представляет собой CD4⁺ Т-клетку.

[0301] В определенных вариантах осуществления в любой из композиций, содержащих Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, предоставленный в настоящем документе, по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе, или точно или приблизительно от 15% до точно или приблизительно 90%, точно или приблизительно от 20% до точно или приблизительно 80%, точно или приблизительно от 30% до точно или приблизительно 70%, или точно или приблизительно от 40% до точно или приблизительно 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки. В определенных вариантах осуществления в любой из композиций, содержащих Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, предоставленный в настоящем документе, по меньшей мере или приблизительно 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе,

или точно или приблизительно от 15% до точно или приблизительно 90%, точно или приблизительно от 20% до точно или приблизительно 80%, точно или приблизительно от 30% до точно или приблизительно 70%, или точно или приблизительно от 40% до точно или приблизительно 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе, или точно или приблизительно от 15% до точно или приблизительно 90%, точно или приблизительно от 20% до точно или приблизительно 80%, точно или приблизительно от 30% до точно или приблизительно 70%, или точно или приблизительно от 40% до точно или приблизительно 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки.

[0302] В определенных вариантах осуществления в любой из композиций, содержащих Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, предоставленный в настоящем документе, по меньшей мере или приблизительно 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺/CD8⁺-клеток в композиции или стандартной дозе представляют собой или стандартная доза, или точно или приблизительно от 50% до точно или приблизительно 90%, точно или приблизительно от 60% до точно или приблизительно 90%, точно или приблизительно от 70% до точно или приблизительно 80%, каждое включительно, всех рецептор⁺/CD8⁺-клеток в композиции или стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-, или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-, или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки. В определенных вариантах осуществления в любой из композиций, содержащих Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, предоставленный в настоящем документе, по меньшей мере или приблизительно 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺/CD4⁺-клеток в композиции или стандартной дозе представляют собой или стандартная доза, или точно или приблизительно от 50% до точно или приблизительно 90%, точно или приблизительно от 60% до точно или приблизительно 90%, точно или приблизительно от 70% до точно или приблизительно 80%, каждое включительно, всех рецептор⁺/CD4⁺-клеток в композиции или стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-, или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-, или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺/CD8⁺-клеток в композиции представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки; или по меньшей мере или приблизительно 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺/CD4⁺-клеток в композиции представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки.

[0303] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит не более чем точно или приблизительно 1×10^8 , не более чем точно или приблизительно 5×10^7 , не более чем точно или приблизительно 1×10^7 , не более чем точно или приблизительно 5×10^6 , не более чем точно или приблизительно 1×10^6 , или не более чем точно или приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток.

[0304] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

[0305] В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления стандартная доза всего содержит не более чем точно или приблизительно 1×10^8 , не более чем точно или приблизительно 5×10^7 , не более чем точно или приблизительно 1×10^7 , не более чем точно или приблизительно 5×10^6 , не более чем точно или приблизительно 1×10^6 , или не более чем точно или приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

[0306] В определенных вариантах осуществления стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

[0307] В определенных вариантах осуществления предоставляемые способы включают введение дозы, содержащей определенное количество клеток. В определенных

вариантах осуществления доза, такая как определенное количество клеток, такая как определенное количество CAR⁺-клеток, которые представляют собой CCR7⁺/CD4⁺-, CCR7⁺/CD8⁺-, CD27⁺/CD4⁺-, CD27⁺/CD8⁺-, CD45RA⁺/CD4⁺-, CD45RA⁺/CD8⁺-, CCR7⁻/CD4⁺-, CCR7⁻/CD8⁺-, CD27⁻/CD4⁺-, CD27⁻/CD8⁺-, CD45RA⁻/CD4⁺-, CD45RA⁻/CD8⁺-, CCR7⁺/CD27⁺/CD4⁺-, CCR7⁺/CD27⁺/CD8⁺-, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD4⁺-, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD8⁺-, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD4⁺-, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD8⁺-, CCR7⁻/CD27⁻/CD4⁺- или CCR7⁻/CD27⁻/CD8⁺-клетки, составляет или приблизительно составляет от $5,0 \times 10^6$ до $2,25 \times 10^7$, от $5,0 \times 10^6$ до $2,0 \times 10^7$, от $5,0 \times 10^6$ до $1,5 \times 10^7$, от $5,0 \times 10^6$ до $1,0 \times 10^7$, от $5,0 \times 10^6$ до $7,5 \times 10^6$, от $7,5 \times 10^6$ до $2,25 \times 10^7$, от $7,5 \times 10^6$ до $2,0 \times 10^7$, от $7,5 \times 10^6$ до $1,5 \times 10^7$, от $7,5 \times 10^6$ до $1,0 \times 10^7$, от $1,0 \times 10^7$ до $2,25 \times 10^7$, от $1,0 \times 10^7$ до $2,0 \times 10^7$, от $1,0 \times 10^7$ до $1,5 \times 10^7$, от $1,5 \times 10^7$ до $2,25 \times 10^7$, от $1,5 \times 10^7$ до $2,0 \times 10^7$, от $2,0 \times 10^7$ до $2,25 \times 10^7$. В определенных вариантах осуществления такая доза, такая как такое определенное количество клеток относится ко всем экспрессирующим рекомбинантный рецептор клеткам во вводимой композиции. В определенных аспектах определенное количество вводимых экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток представляют собой клетки, которые негативны (-) по маркерам апоптоза, и необязательно, где маркеры апоптоза представляют собой аннексин V или активированную каспазу 3.

[0308] В определенных вариантах осуществления доза клеток стандартной дозы содержит определенное количество клеток, такое как определенное количество клеток по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно от 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 10×10^6 до приблизительно 15×10^6 экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, таких как экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, которые представляют собой CCR7⁺/CD4⁺-, CCR7⁺/CD8⁺-, CD27⁺/CD4⁺-, CD27⁺/CD8⁺-, CD45RA⁺/CD4⁺-, CD45RA⁺/CD8⁺-, CCR7⁻/CD4⁺-, CCR7⁻/CD8⁺-, CD27⁻/CD4⁺-, CD27⁻/CD8⁺-, CD45RA⁻/CD4⁺-, CD45RA⁻/CD8⁺-, CCR7⁺/CD27⁺/CD4⁺-, CCR7⁺/CD27⁺/CD8⁺-, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD4⁺-, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD8⁺-, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD4⁺-, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD8⁺-, CCR7⁻/CD27⁻/CD4⁺- или CCR7⁻/CD27⁻/CD8⁺-клетки и/или которые являются негативными (-) по маркерам апоптоза и CD8⁺, необязательно, где маркеры апоптоза представляют собой аннексин V или активированную каспазу 3.

[0309] В определенных вариантах осуществления дозу клеток вводят индивидуумам предоставляемыми способами и/или с использованием предоставляемых промышленных изделий или композиций. В определенных вариантах осуществления величину или временные интервалы введения доз определяют как функцию конкретных заболевания или патологического состояния у индивидуума. В определенных случаях величину или временные интервалы введения доз для конкретного заболевания с учетом предоставляемого описания можно определять эмпирически.

[0310] В определенных вариантах осуществления доза клеток содержит точно или приблизительно от 2×10^5 клеток/кг до точно или приблизительно 2×10^6 клеток/кг, так как точно или приблизительно от 4×10^5 клеток/кг до точно или приблизительно 1×10^6 клеток/кг или точно или приблизительно от 6×10^5 клеток/кг до точно или

приблизительно 8×10^5 клеток/кг. В определенных вариантах осуществления доза клеток содержит не более чем 2×10^5 клеток (например, экспрессирующих антиген, таких как экспрессирующих CAR клеток) на килограмм массы тела индивидуума (клеток/кг), например, не более чем точно или приблизительно 3×10^5 клеток/кг, не более чем точно или приблизительно 4×10^5 клеток/кг, не более чем точно или приблизительно 5×10^5 клеток/кг, не более чем точно или приблизительно 6×10^5 клеток/кг, не более чем точно или приблизительно 7×10^5 клеток/кг, не более чем точно или приблизительно 8×10^5 клеток/кг, не более чем точно или приблизительно 9×10^5 клеток/кг, не более чем точно или приблизительно 1×10^6 клеток/кг или не более чем точно или приблизительно 2×10^6 клеток/кг. В определенных вариантах осуществления доза клеток содержит по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 2×10^5 клеток (например, экспрессирующих антиген, таких как экспрессирующих CAR клеток) на килограмм массы тела индивидуума (клеток/кг), например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 3×10^5 клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 4×10^5 клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 5×10^5 клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 6×10^5 клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 7×10^5 клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 8×10^5 клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 9×10^5 клеток/кг, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 1×10^6 клеток/кг, или по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно или точно или приблизительно 2×10^6 клеток/кг.

[0311] В определенных вариантах осуществления клетки, или отдельные популяции подтипов клеток, вводят индивидууму в диапазоне точно или приблизительно от 0,1 миллиона до точно или приблизительно 100 миллиардов клеток и/или такое количество клеток на килограмм массы тела индивидуума, такое как, например, точно или приблизительно от 0,1 миллиона до точно или приблизительно 50 миллиардов клеток (например, точно или приблизительно 5 миллионов клеток, точно или приблизительно 25 миллионов клеток, точно или приблизительно 500 миллионов клеток, точно или приблизительно 1 миллиард клеток, точно или приблизительно 5 миллиардов клеток, точно или приблизительно 20 миллиардов клеток, точно или приблизительно 30 миллиардов клеток, точно или приблизительно 40 миллиардов клеток, или диапазон, определенный любыми двумя из указанных выше значений), точно или приблизительно от 1 миллиона до точно или приблизительно 50 миллиардов клеток (например, точно или приблизительно 5 миллионов клеток, точно или приблизительно 25 миллионов клеток, точно или приблизительно 500 миллионов клеток, точно или приблизительно 1 миллиард клеток, точно или приблизительно 5 миллиардов клеток, точно или приблизительно 20 миллиардов клеток, точно или приблизительно 30 миллиардов клеток, точно или

приблизительно 40 миллиардов клеток, или диапазон, определенный любыми двумя из указанных выше значений), например, точно или приблизительно от 10 миллионов до точно или приблизительно 100 миллиардов клеток (например, точно или приблизительно 20 миллионов клеток, точно или приблизительно 30 миллионов клеток, точно или приблизительно 40 миллионов клеток, точно или приблизительно 60 миллионов клеток, точно или приблизительно 70 миллионов клеток, точно или приблизительно 80 миллионов клеток, точно или приблизительно 90 миллионов клеток, точно или приблизительно 10 миллиардов клеток, точно или приблизительно 25 миллиардов клеток, точно или приблизительно 50 миллиардов клеток, точно или приблизительно 75 миллиардов клеток, точно или приблизительно 90 миллиардов клеток, или диапазон, определенный любыми двумя из указанных выше значений), и в определенных случаях точно или приблизительно от 100 миллионов клеток до точно или приблизительно 50 миллиардов клеток (например, точно или приблизительно 120 миллионов клеток, точно или приблизительно 250 миллионов клеток, точно или приблизительно 350 миллионов клеток, точно или приблизительно 450 миллионов клеток, точно или приблизительно 650 миллионов клеток, точно или приблизительно 800 миллионов клеток, точно или приблизительно 900 миллионов клеток, точно или приблизительно 3 миллиардов клеток, точно или приблизительно 30 миллиардов клеток, точно или приблизительно 45 миллиардов клеток) или любое значение между этими диапазонами и/или на килограмм массы тела индивидуума. Дозы могут варьировать в зависимости от признаков, специфичных для заболевания или нарушения, и/или пациента, и/или других видов лечения. В определенных вариантах осуществления доза клеток представляет собой постоянную дозу клеток или фиксированную дозу клеток так, что доза клеток не привязана или не основана на площадь поверхности тела или массы индивидуума.

[0312] В определенных вариантах осуществления, например, когда индивидуум является человеком, доза всего содержит менее чем приблизительно 5×10^8 экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (PBMC), например, в диапазоне точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 5×10^8 таких клеток, например, точно или приблизительно 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$ или 5×10^8 всех таких клеток или диапазон между любыми двумя из указанных выше значений. В определенных вариантах осуществления например, когда индивидуум является человеком, доза всего содержит более чем точно или приблизительно 1×10^6 экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) и менее чем точно или приблизительно 2×10^9 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (PBMC), например, всего в диапазоне точно или приблизительно от $2,5 \times 10^7$ до точно или приблизительно $1,2 \times 10^9$ таких клеток, например, точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, $5 \times$

10^7 , 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$ всех таких клеток или диапазон между любыми двумя из указанных выше значений.

[illegible]

[0315] В определенных вариантах осуществления клеточная терапия включает введение дозы, всего содержащей количество клеток от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до 5×10^8 экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), от или приблизительно от 5×10^5 до или приблизительно до 1×10^7 экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) или от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 1×10^7 экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), каждое включительно. В определенных вариантах осуществления клеточная терапия включает введение дозы клеток, всего содержащей количество клеток по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^5 экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), например, по меньшей мере или по меньшей мере 1×10^6 , по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^7 , по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^8 таких клеток. В определенных вариантах осуществления количество указано относительно общего количества $CD3^+$ - или $CD8^+$ -клеток, в определенных случаях также экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR^+) клеток. В определенных вариантах осуществления клеточная терапия включает введение дозы, всего содержащей количество клеток от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до 5×10^8 $CD3^+$ или $CD8^+$ Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD3^+$ или $CD8^+$ клеток, от или приблизительно от 5×10^5 до или приблизительно до 1×10^7 $CD3^+$ или $CD8^+$ Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD3^+$ или $CD8^+$ клеток, или от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 1×10^7 $CD3^+$ или $CD8^+$ Т-клеток или экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD3^+$ или $CD8^+$ клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления клеточная терапия включает введение дозы, всего содержащей количество клеток от или приблизительно от 1×10^5 до или приблизительно до 5×10^8 $CD3^+/CAR^+$ - или $CD8^+/CAR^+$ -клеток, от или приблизительно от 5×10^5 до или приблизительно до 1×10^7 $CD3^+/CAR^+$ - или $CD8^+/CAR^+$ -клеток или от или приблизительно от 1×10^6 до или приблизительно до 1×10^7 $CD3^+/CAR^+$ или $CD8^+/CAR^+$ -клеток, каждое включительно.

[0316] В определенных вариантах осуществления Дозы Т-клеток содержат $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки или $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки.

[0317] В определенных вариантах осуществления например, когда индивидуум является человеком, $CD8^+$ Т-клетки дозы, содержащиеся в дозе, содержащей $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки, включают точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 5×10^8 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) $CD8^+$ клеток, например, в диапазоне точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^8 таких клеток, например, всего 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 или диапазон между любыми двумя из указанных выше

значений. В определенных вариантах осуществления пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или суммарная доза может находиться в пределах любых из указанных выше значений. В определенных вариантах осуществления доза клеток включает введение всего от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до $0,75 \times 10^8$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до 5×10^7 экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, от или приблизительно от 1×10^7 до или приблизительно до $0,25 \times 10^8$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления доза клеток включает введение всего точно или приблизительно 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$ или 5×10^8 экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток.

[0318] В определенных вариантах осуществления доза клеток, например, экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, вводят индивидууму в виде однократной дозы или вводят только один раз в пределах периода длительностью две недели, один месяц, три месяца, шесть месяцев, 1 года или более.

[0319] В рамках адоптивной клеточной терапии введение данной "доза" включает введение данного количества клеток в виде одной композиции и/или одного непрерывного введения, например, в виде одной инъекции или непрерывной инфузии, а также включает введение данного количества клеток в виде разделенной дозы или в виде множества композиций, предоставляемых в нескольких отдельных композициях или инфузиях, в течение указанного периода времени, например, в течение периода не более 3 суток. Таким образом, в определенных контекстах, доза представляет собой однократное или непрерывное введение указанного количества клеток, проводимое или начинаемое в один момент времени. Однако в определенных контекстах дозу вводят в виде нескольких инъекций или инфузий в течение периода не более трех суток, например, раз сутки в течение трех суток или в течение двух суток или посредством нескольких инфузий в течение одних суток.

[0320] Таким образом, в определенных аспектах клетки дозы вводят в одной фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления клетки дозы вводят во множестве композиций, вместе содержащих клетки дозы.

[0321] В определенных вариантах осуществления термин "разделенная доза" относится к дозе, которая разделена так что ее вводят в течение периода длительностью более одних суток. Этот тип дозирования включен в способы настоящего изобретения и считается одной дозой.

[0322] Таким образом, дозу клеток можно вводить в виде разделенной дозы, например, разделенной дозы, вводимой в течение определенного периода времени. Например, в определенных вариантах осуществления дозу можно вводить индивидууму в течение 2 суток или в течение 3 суток. Иллюстративные способы для разделенного дозирования включают введение 25% дозы в первые сутки и введение оставшихся 75% дозы во вторые сутки. В других вариантах осуществления 33% дозы можно вводить в

первые сутки, а оставшиеся 67% вводить во вторые сутки. В определенных аспектах 10% дозы вводят в первые сутки, 30% дозы вводят во вторые сутки, и 60% дозы вводят в третьи сутки. В определенных вариантах осуществления разделенную дозу не распределяют на период более 3 суток.

[0323] В определенных вариантах осуществления клетки дозы можно вводить посредством введения множества композиций или растворов, таких как первый и второй, необязательно, больше, где каждый содержит определенное количество клеток дозы. В определенных аспектах множество композиций, где каждая содержит различные популяции и/или подтипы клеток, вводят отдельно или независимо, необязательно в пределах определенного периода времени. Например, популяции или подтипы клеток могут включать $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки, соответственно, и/или обогащенные $CD8^+$ - и $CD4^+$ -клетками популяции, соответственно, например, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клетки, где каждые отдельно включают клетки, подвергнутые генетической инженерии так, чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор. В определенных вариантах осуществления введение дозы включает введение первой композиции, содержащей дозу $CD8^+$ Т-клеток или дозу $CD4^+$ Т-клеток, и введение второй композиции, содержащей другую дозу $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток.

[0324] В определенных вариантах осуществления введение композиции или дозы, например, введение множества клеток композиции, включает введение клеток композиции отдельно. В определенных аспектах отдельные введения проводят одновременно или последовательно в любом порядке. В определенных вариантах осуществления доза содержит первую композицию и вторую композицию, и первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от 0 до 12 часов, с интервалом от 0 до 6 часов или с интервалом от 0 до 2 часов. В определенных вариантах осуществления начало введения первой композиции и начало введения второй композиции проводят с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа или не более 30 минут, с интервалом не более 15 минут, не более 10 минут или не более 5 минут. В определенных вариантах осуществления начало и/или завершение введения первой композиции и завершение и/или начало введения второй композиции проводят с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа или не более 30 минут, с интервалом не более 15 минут, не более 10 минут или не более 5 минут.

[0325] В определенных вариантах осуществления первая композиция, например, первая композиция дозы, содержит $CD4^+$ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления первая композиция, например, первая композиция дозы, содержит $CD8^+$ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления первую композицию вводят до второй композиции. В определенных вариантах осуществления вторая композиция, например, вторая композиция дозы, содержит $CD4^+$ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления вторая композиция, например, вторая композиция дозы, содержит $CD8^+$ Т-клетки.

[0326] В определенных вариантах осуществления доза или композиция клеток содержит определенное или заданное отношение $CD4^+$ -клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и $CD8^+$ -клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и/или $CD4^+$ -клеток и $CD8^+$ -клеток, где это отношение необязательно составляет приблизительно 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1, например, приблизительно 1:1. В определенных аспектах введение композиции или дозы с заданным или требуемым отношением различных популяций клеток (например, отношением $CD4^+ : CD8^+$ или отношением $CAR^+CD4^+ : CAR^+CD8^+$, например, 1:1) включает введение композиции клеток, содержащей одну из популяций, а затем введение отдельной композиции клеток, содержащей другую популяцию, где введение точно или приблизительно находится в заданном или требуемом отношении. В определенных аспектах введение дозы или композиции клеток в определенном отношении приводит к улучшенному развитию, продолжительности и/или противоопухолевой активности Т-клеточной терапии.

[0327] В определенных вариантах осуществления индивидуум получает несколько доз, например, две или более доз или несколько последовательных доз клеток. В определенных вариантах осуществления индивидууму вводят две дозы. В определенных вариантах осуществления индивидуум получает следующую дозу, 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 сутки после первой дозы. В определенных вариантах осуществления после первой дозы вводят несколько последующих доз так, что после введения каждой следующей дозы вводят дополнительную дозу или дозы. В определенных аспектах количество клеток, вводимых индивидууму в дополнительной дозе, является таким же или сходным с первой дозой и/или последующей дозой. В определенных вариантах осуществления дополнительные дозы являются большими, чем предыдущие дозы.

[0328] В определенных аспектах величину первой и/или последующей дозы определяют на основе одного или нескольких критериев, таких как ответ индивидуума на предыдущее лечение, например, химиотерапию, тяжесть заболевания у индивидуума, такую как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, распространенность или тип метастазирования, стадия и/или вероятность или частота развития у индивидуумов токсических исходов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

[0329] В определенных аспектах время между введением первой дозы и введением последующей дозы составляет приблизительно от 9 до приблизительно 35 суток, приблизительно от 14 до приблизительно 28 суток или от 15 до 27 суток. В определенных вариантах осуществления введение последующей дозы проводят в определенный момент времени, больший, чем приблизительно через 14 суток после, и меньший, чем приблизительно через 28 суток после введения первой дозы. В определенных аспектах время между первой и последующей дозой составляет приблизительно 21 сутки. В

определенных вариантах осуществления после введения последующей дозы вводят дополнительную дозу или дозы, например, последующие дозы. В определенных аспектах дополнительные последующие дозу или дозы вводят по меньшей мере приблизительно через 14 и менее чем приблизительно через 28 суток после введения предшествующей дозы. В определенных вариантах осуществления дополнительную дозу вводят менее чем приблизительно через 14 суток после предшествующей дозы, например, через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 суток после предшествующей дозы. В определенных вариантах осуществления никакой дозы не вводят менее чем приблизительно через 14 суток после предшествующей дозы и/или никакой дозы не вводят более чем приблизительно через 28 суток после предшествующей дозы.

[0330] В определенных вариантах осуществления доза клеток, например, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, содержит две дозы (например, двойную дозу), содержащих первую дозу Т-клеток и последующую дозу Т-клеток, где одна или первая доза и вторая доза включает введение разделенной дозы Т-клеток.

[0331] В определенных вариантах осуществления доза клеток, как правило, является достаточно большой, чтобы быть эффективной в снижении тяжести заболевания.

[0332] В определенных вариантах осуществления клетки вводят в требуемой дозировке, которая в определенных аспектах включает требуемую дозу, или количество клеток, или тип клеток, и/или требуемое отношение типов клеток. Таким образом, дозировка клеток в определенных вариантах осуществления основана на общем количестве клеток (или количестве на кг массы тела) и требуемом отношении определенных популяций или подтипов, таком как отношение $CD4^+$ и $CD8^+$. В определенных вариантах осуществления дозировка клеток основана на требуемом общем количестве (или количестве на кг массы тела) клеток определенных популяций или определенных типов клеток. В определенных вариантах осуществления дозировка основана на комбинации таких характеристик, например, требуемого количества всех клеток, требуемого отношения и требуемого общего количества клеток определенных популяций.

[0333] В определенных вариантах осуществления популяции или подтипы клеток, такие как $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки, вводят с допустимым отклонением от требуемой дозы всех клеток, таких как требуемая доза Т-клеток, или в его пределах. В определенных аспектах требуемая доза представляет собой требуемое количество клеток или требуемое количество клеток на единицу массы тела индивидуума, которому вводят клетки, например, клеток/кг. В определенных аспектах требуемая доза составляет или превышает минимальное количество клеток или минимальное количество клеток на единицу массы тела. В определенных аспектах во всех клетках, вводимых в требуемой дозе, определенные популяции или подтипы находятся в требуемом выходном отношении (таком как отношение $CD4^+$ и $CD8^+$) или близко к нему, например, в пределах определенного допустимого отклонения или ошибки такого отношения.

[0334] В определенных вариантах осуществления клетки вводят с допустимым отклонением от требуемой дозы одной или нескольких определенных популяций или подтипов клеток, например, требуемой дозы $CD4^+$ -клеток и/или требуемой дозы $CD8^+$ -клеток, или в его пределах. В определенных аспектах требуемая доза представляет собой требуемое количество клеток подтипа или популяции или требуемое количество таких клеток на единицу массы тела индивидуума, которому вводят клетки, например, клеток/кг. В определенных аспектах требуемая доза составляет или превышает минимальное количество клеток популяции или подтипа, или минимальное количество клеток популяции или подтипа на единицу массы тела.

[0335] Таким образом, в определенных вариантах осуществления дозировка основана на требуемой фиксированной дозе всех клеток и требуемом отношении и/или основана на требуемой фиксированной дозе одного или нескольких, например, каждого из определенных подтипов или субпопуляций. Таким образом, в определенных вариантах осуществления дозировка основана на требуемой фиксированной или минимальной дозе Т-клеток и требуемом отношении $CD4^+$ и $CD8^+$ -клеток и/или основана на требуемой фиксированной или минимальной дозе $CD4^+$ и/или $CD8^+$ -клеток.

[0336] В определенных вариантах осуществления клетки вводят в допустимом диапазоне требуемого выходного отношения нескольких популяций или подтипов клеток, таких как $CD4^+$ - и $CD8^+$ -клетки или подтипы клеток, или в его пределах. В определенных аспектах требуемое отношение может представлять собой конкретное отношение или может представлять собой диапазон отношений. Например, в определенных вариантах осуществления требуемое отношение (например, отношение $CD4^+$ и $CD8^+$ -клеток) составляет точно или приблизительно от 1:5 до точно или приблизительно 5:1 (или более чем приблизительно 1:5 и менее чем приблизительно 5:1), или точно или приблизительно от 1:3 до точно или приблизительно 3:1 (или более чем приблизительно 1:3 и менее чем приблизительно 3:1), так как точно или приблизительно от 2:1 до точно или приблизительно 1:5 (или более чем приблизительно 1:5 и менее чем приблизительно 2:1), например, точно или приблизительно 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9: 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 или 1:5. В определенных аспектах допустимое отклонение 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 отношения, включая любое значение между этими диапазонами.

[0337] В конкретных вариантах осуществления количества и/или концентрации клеток относятся к количеству экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток. В других вариантах осуществления количества и/или концентрации клеток относятся к количеству или концентрации всех вводимых клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

[0338] В определенных аспектах величину дозы определяют на основе одного или нескольких критериев, таких как ответ индивидуума на предыдущее лечение, например, химиотерапию, тяжесть заболевания у индивидуума, так как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, распространенность или тип метастазирования, стадия и/или вероятность или частота развития у индивидуумов токсических исходов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

[0339] В определенных вариантах осуществления способы также включают введение одной или нескольких дополнительных доз клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) и/или проведение терапии для лимфодеплеции, и/или повторение одного или нескольких этапов этих способов. В определенных вариантах осуществления одна или несколько дополнительных доз являются такими же, как начальная доза. В определенных вариантах осуществления одна или несколько дополнительных доз отличаются от начальной дозы, например, являются большими, например, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз или в 10 или более раз большими, чем начальная доза, или меньшими, например, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз или в 10 или более раз меньшими, чем начальная доза. В определенных вариантах осуществления введение одной или нескольких дополнительных доз определяют на основе ответа индивидуума на начальное лечение или любое предыдущее лечение, тяжести заболевания у индивидуума, такой как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, распространенность или тип метастазирования, стадия и/или вероятность или частота развития у индивидуумов токсических исходов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

С. Способы лечения

[0340] В настоящем документе предоставлены способы лечения, например, включающие введение любых подвергнутых инженерии клеток или композиций, содержащих подвергнутые инженерии клетки, описываемые в настоящем документе, включая одну или несколько доз, например, стандартные дозы, или любых композиций, содержащих одну или несколько стандартных доз, описываемых в настоящем документе. В определенных аспектах также предоставлены способы введения любых подвергнутых инженерии клеток или композиций, содержащих подвергнутые инженерии клетки или стандартные дозы, описываемые в настоящем документе, индивидууму, такому как индивидуум с заболеванием или нарушением. В определенных аспектах также предоставлены применения любых подвергнутых инженерии клеток или композиций, содержащих подвергнутые инженерии клетки, описываемые в настоящем документе, для лечения заболевания или нарушения. В определенных аспектах также предоставлены применения любых подвергнутых инженерии клеток или композиций, содержащих подвергнутые инженерии клетки или стандартные дозы, описываемые в настоящем

документе, для получения лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения. В определенных аспектах также предоставлены любые подвергнутые инженерии клетки или композиции, содержащие подвергнутые инженерии клетки или стандартные дозы, описываемые в настоящем документе, для применения в лечении заболевания или нарушения или для введения индивидууму с заболеванием или нарушением.

[0341] Подвергнутые инженерии клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR), или содержащие их композиции пригодны при множестве терапевтических, диагностических и профилактических показаний. Например, подвергнутые инженерии клетки или композиции, содержащие подвергнутые инженерии клетки, пригодны при лечении ряда заболеваний и нарушений у индивидуума. Такие способы и применения включают терапевтические способы и применения, например, включающие введение подвергнутых инженерии клеток или содержащих их композиций индивидууму с заболеванием, патологическим состоянием или нарушением, таким как опухоль или злокачественная опухоль. В определенных вариантах осуществления подвергнутые инженерии клетки или содержащие их композиции вводят в эффективном количестве для эффективного лечения заболевания или нарушения. Применения включают применения подвергнутых инженерии клеток или композиций в таких способах и средствах лечения и в получении лекарственного средства для проведения таких терапевтических способов. В определенных вариантах осуществления способы проводят посредством введения подвергнутых инженерии клеток или содержащих их композиций индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием или с подозрением на их наличие. Таким образом, в определенных вариантах осуществления этими способами проводят лечение заболевания, или патологического состояния, или нарушения у индивидуума.

[0342] Известны способы для введения клеток для адоптивной клеточной терапии и их можно использовать вместе с предоставляемыми способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации патентной заявки США № 2003/0170238, выданной Gruenberg et al; патенте США № 4690915, выданном Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol*. 8(10):577-85). См., например, Themeli et al. (2013) *Nat Biotechnol*. 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) *PLoS One* 8(4): e61338.

[0343] Заболевание или патологическое состояние, которое подвергают лечению, может являться любым, где экспрессия антигена ассоциирована и/или вовлечена в этиологию патологического состояния или нарушения, например, вызывает, обостряет или иным образом вовлечена в такие заболевание, патологическое состояние или нарушение. Иллюстративные заболевания и патологические состояния могут включать заболевания или патологические состояния, ассоциированные со злокачественными новообразованиями или трансформацией клеток (например, злокачественная опухоль), аутоиммунные или воспалительные заболевания или инфекционные заболевания,

например, вызываемые бактериальным, вирусным или другим патогеном. Иллюстративные антигены, которые включают антигены, ассоциированные с различными заболеваниями и патологическими состояниями, которые можно подвергать лечению, описаны выше. В конкретных вариантах осуществления химерный антигенный рецептор или трансгенный TCR специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или патологическим состоянием.

[0344] В число заболеваний, патологических состояний и нарушений входят опухоли, включая солидные опухоли, гематологические злокачественные новообразования и меланомы, и включая локализованные и метастатические опухоли, инфекционные заболевания, такие как инфекция вирусом или другим патогеном, например, ВИЧ, HCV, HBV, CMV, HPV и паразитарные заболевания, и аутоиммунные и воспалительные заболевания. В определенных вариантах осуществления заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой опухоль, злокачественную опухоль, злокачественное новообразование, неоплазию или другое пролиферативное заболевание или нарушение. В определенных вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование. В определенных вариантах осуществления В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой лейкоз или лимфому. Такие заболевания в качестве неограничивающих примеров включают 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), мелкоклеточную лимфому (SLL), лимфому мантийных клеток (MCL), лимфому маргинальной зоны, лимфому Беркитта, лимфому Ходжкина (HL), неходжкинскую лимфому (NHL), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL), фолликулярную лимфому, устойчивую фолликулярную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) и множественную миелому (MM). В определенных вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование, выбранное из острого лимфобластного лейкоза (ALL), ALL взрослых, хронического лимфобластного лейкоза (CLL), неходжкинской лимфомы (NHL), и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL). В определенных вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой NHL и NHL, выбранную из группы, состоящей из агрессивной NHL, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), NOS (de novo и трансформированной из медленно растущей), первичной медиастинальной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (PMBCL), богатой Т-клетками/гистиоцитами крупноклеточной В-клеточной лимфомы (TCHRBCL), лимфомы Беркитта, лимфомы мантийных клеток (MCL) и/или фолликулярной лимфомы (FL), необязательно, фолликулярной лимфомы степени 3В (FL3В).

[0345] В определенных аспектах заболевание или патологическое состояние представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ALL), ALL взрослых, хронический лимфобластный лейкоз (CLL), неходжкинскую лимфому (NHL) или диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL). В определенных случаях заболевание или патологическое состояние представляет собой NHL, такую как или включающую NHL, которая представляет собой агрессивную NHL, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), NOS (de novo и трансформированную из медленнорастущей), первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому (PMBCL), богатую Т-клетками/гистиоцитами крупноклеточную В-клеточную лимфому (TCHRBCL), лимфому Беркитта, лимфому мантийных клеток (MCL) и/или фолликулярную лимфому (FL), необязательно, фолликулярную лимфому степени 3В (FL3В). В определенных аспектах рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или патологическим состоянием или экспрессируемым в клетках окружения очага поражения, ассоциированного с В-клеточным злокачественным новообразованием. Антигены, к которым направлены рецепторы, в определенных вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любой из ряда известных В-клеточных маркеров. В определенных вариантах осуществления антиген, к которому направлен рецептор, представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30 или их сочетания.

[0346] В определенных вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой миелому, такую как множественная миелома. В определенных аспектах рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или патологическим состоянием или экспрессируемым в клетках окружения очага поражения, ассоциированного с множественной миеломой. Антигены, к которым направлены рецепторы, в определенных вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с множественной миеломой. В определенных аспектах на множественной миеломе экспрессирован антиген, например, второй или дополнительный антиген, такой как специфичный для заболевания антиген и/или связанный антиген, например, антиген созревания В-клеток (BCMA), представитель D группы 5 класса C сопряженных с G-белками рецепторов (GPCR5D), CD38 (гидролаза циклической АДФ-рибозы), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, подмножество 1 CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24), BAFF-R, TACI и/или FcRH5. Другие иллюстративные антигены множественной миеломы включают CD56, TIM-3, CD33, CD123, CD44, CD20, CD40, CD74, CD200, EGFR, β 2-микроглобулин, HM1.24, IGF-1R, IL-6R, TRAIL-R₁ и рецептор активина типа IIA (ActRIIA). См. Benson and Byrd, J. Clin. Oncol. (2012) 30(16): 2013-15; Tao and Anderson, Bone Marrow Research (2011):924058; Chu et al., Leukemia (2013) 28(4):917-27; Garfall et al., Discov Med. (2014) 17(91):37-46. В определенных

вариантах осуществления антигены включают антигены, представленные на лимфоидных опухолях, миеломе, ассоциированной со СПИД лимфоме и/или посттрансплантационных лимфопролиферативных расстройствах, например, CD38. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, направленные к таким антигенам, известны и включают, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в патентах США № 8153765; 8603477, 8008450; патентах США № US20120189622 или US20100260748 и/или международных публикациях PCT №№ WO2006099875, WO2009080829 или WO2012092612 или WO2014210064. В определенных вариантах осуществления такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (например, scFv) содержатся в полиспецифических антителах, полиспецифичных химерных рецепторах, таких как полиспецифичные CAR, и/или полиспецифичных клетках.

[0347] В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение ассоциирован с экспрессией представителя D группы 5 класса C сопряженных с G-белками рецепторов (GPC5D) и/или экспрессией антигена созревания В-клеток (BCMA).

[0348] В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой В-клеточное нарушение. В некоторых из всех предоставляемых вариантов осуществления предоставляемых способов заболевание или нарушение, ассоциированное с BCMA, представляет собой аутоиммунное заболевание или нарушение. В некоторых из всех предоставляемых вариантов осуществления предоставляемых способов аутоиммунное заболевание или нарушение представляет собой системную красную волчанку (SLE), волчаночный нефрит, воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, ассоциированный с ANCA васкулит, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP), аутоиммунную тромбоцитопению, болезнь Шагаса, болезнь Грейва, гранулематоз Вегенера, узелковый полиартериит, синдром Шегрена, обыкновенную пузычатку, склеродермию, рассеянный склероз, псориаз, нефропатию IgA-типа, полинейропатии IgM-типа, васкулит, сахарный диабет, синдром Рейно, антифосфолипидный синдром, болезнь Гудпасчера, болезнь Кавасаки, аутоиммунную гемолитическую анемию, миастению gravis или прогрессирующий гломерулонефрит.

[0349] В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой злокачественную опухоль. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой экспрессирующую GPRC5D злокачественную опухоль. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой плазматическое клеточное злокачественное новообразование, а плазматическое клеточное злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому (MM) или плазмоцитому. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому (MM). В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой рецидивирующую/устойчивую множественную миелому.

[0350] В определенных вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание или патологическое состояние, в качестве неограничивающих примеров такое как вирусная, ретровирусная, бактериальная и протозойная инфекции, иммунодефицит, цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейна-Барр (EBV), аденовирус, полиовирус ВК. В определенных вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание или патологическое 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 Грейва, болезнь Крона, рассеянный склероз, астма и/или заболевание или патологическое состояние, ассоциированное с трансплантатом.

[0351] В определенных вариантах осуществления антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушение или включает интегрин $\alpha v \beta 6$ ($\alpha v \beta 6$ интегрин), антиген созреваия В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раковотестикулярный антиген, антиген рака/семенников 1В (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), раково-эмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, хемокиновый лиганд с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфатпротеогликан 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), мутацию рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин B2, рецептор эфрина A2 (EPHa2), рецептор эстрогенов, подобный Fc-рецептору белок 5 (FCRL5; также известный как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фетальный рецептор ацетилхолина (фетальный AchR), фолатсвязывающий белок (FBP), рецептор фолата альфа, ганглиозид GD2, О-ацетилованный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), сопряженный с G-белком рецептор 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, высокомолекулярный ассоциированный с меланомой антиген человека (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита В, лейкоцитарный антиген человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарный антиген человека A2 (HLA-A2), рецептор IL-22 альфа (IL-22R α), рецептор IL-13 альфа 2 (IL-13R α 2), рецептор со встроенным киназным доменом (kdr), легкая цепь каппа, молекула клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитоп CE7 L1-CAM, представитель А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRRC8A), антиген Льюиса Y, ассоциированный с меланомой антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), с-Met, цитомегаловирус мыши (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белок мелан А (MART-1), молекула адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбриональный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, специфический антиген предстательной железы, антиген стволовых клеток

предстательной железы (PSCA), специфический мембранный антиген предстательной железы (PSMA), орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивин, гликопротеин трофобласта (TPBG также известный как 5T4), опухоль-ассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), связанный с тирозинкиназой белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), связанный с тирозинкиназой белок 2 (TRP2, также известный как дофахромтауомераза, дофахром-дельта-изомераза или DCT), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белок опухоли Вильмаса 1 (WT-1), специфичный для патогена или экспрессируемый на патогене антиген или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены, к которым направлены рецепторы, в определенных вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любой из ряда известных В-клеточных маркеров. В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой или содержит CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

[0352] В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой или содержит специфичный для патогена или экспрессируемый на патогене антиген. В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой вирусный антиген (такой как вирусный антиген ВИЧ, HCV, HBV и т.д.), бактериальные антигены и/или паразитарные антигены.

[0353] В определенных вариантах осуществления клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, проводят посредством аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают у индивидуума, которому проводят клеточную терапию, или из образца, полученного у такого индивидуума. Таким образом, в определенных аспектах клетки получают у индивидуума, например, пациента, нуждающегося в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же индивидууму.

[0354] В определенных вариантах осуществления клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, проводят посредством аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают у индивидуума, отличного от индивидуума, которому необходимо провести или которому в конечном итоге проводят клеточную терапию, например, у первого индивидуума. В таких вариантах осуществления клетки затем вводят другому индивидууму, например, второму индивидууму, того же вида. В определенных вариантах осуществления первый и второй индивидуумы являются генетически идентичными. В определенных вариантах осуществления первый и второй индивидуумы являются генетически сходными. В определенных вариантах осуществления второй индивидуум экспрессирует тот же HLA того же класса или супертипа, что и первый индивидуум.

[0355] Клетки можно вводить любыми подходящими способами, например, посредством болюсной инфузии, посредством инъекции, например, внутривенной или подкожной инъекции, внутриглазной инъекции, периокулярной инъекции, субретинальной инъекции, интравитреальной инъекции, трансептальной инъекции, субсклеральной инъекции, интрахороидальной инъекции, интракамеральной инъекции, субконъюнктивальной инъекции, субконъюнктивальной инъекции, субтеноновой инъекции, ретробульбарной инъекции, околобульбарной инъекции или задней окологсклеральной доставки. В определенных вариантах осуществления их вводят посредством парентерального, внутрилегочного и интраназального, а при необходимости местной обработки, внутриочагового введения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, интраперитонеальное или подкожное введение. В определенных вариантах осуществления назначенную дозу вводят посредством единичного болюсного введения клеток. В определенных вариантах осуществления его проводят посредством нескольких болюсных введений клеток, например, в течение периода длительностью не более 3 суток, или посредством непрерывного инфузионного введения клеток. В определенных вариантах осуществления введение дозы клеток или проведение любой дополнительной терапии, например, терапии для лимфодеплеции, интервенционной терапии и/или комбинированной терапии, проводят амбулаторно.

[0356] Для профилактики или лечения заболевания соответствующая дозировка может зависеть от типа подлежащего лечению заболевания, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, введения клеток в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, анамнеза индивидуума и ответа на клетки и решения лечащего врача. В определенных вариантах осуществления композиции и клетки соответствующим образом вводят индивидууму за один раз или в течение ряда процедур.

[0357] В определенных вариантах осуществления клетки вводят как часть комбинированной терапии, например, одновременно или последовательно с другой терапевтической интервенцией, такой как антитело или подвергнутые инженерии клетки или рецептор или такое средство, как цитотоксическое или терапевтическое средство, в любом порядке. В определенных вариантах осуществления клетки вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами или в связи с другой терапевтической интервенцией, одновременно или последовательно в любом порядке. В определенных контекстах клетки вводят совместно с другим терапевтическим средством достаточно близко по времени так, что популяции клеток усиливают действие одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, или наоборот. В определенных вариантах осуществления клетки вводят до одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. В определенных вариантах осуществления клетки вводят после одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. В определенных вариантах осуществления одно или несколько дополнительных средств

включают цитокин, например, такой как IL-2, для увеличения продолжительности. В определенных вариантах осуществления способы включают введение химиотерапевтического средства.

[0358] В определенных вариантах осуществления способы включают введение химиотерапевтического средства, например, подготавливающего химиотерапевтического средства, например, для снижения опухолевой нагрузки до введения.

[0359] Предварительная подготовка индивидуумов с применением терапевтических средств для иммунодеплеции (например, лимфодеплеции) в определенных аспектах может улучшить действие адоптивной клеточной терапии (АСТ).

[0360] Таким образом, в определенных вариантах осуществления способы включают введение индивидууму средства для предварительной подготовки, такого как средство для лимфодеплеции или химиотерапевтическое средство, такое как циклофосфамид, флударабин или их сочетания, до начала клеточной терапии. Например, индивидууму можно вводить средство для предварительной подготовки по меньшей мере за 2 суток, например, по меньшей мере за 3, 4, 5, 6 или 7 суток до начала клеточной терапии. В определенных вариантах осуществления индивидууму вводят средство для предварительной подготовки не более чем за 7 суток, например, не более чем 6, 5, 4, 3 или 2 суток до начала клеточной терапии.

[0361] В определенных вариантах осуществления индивидуума предварительно подготавливают с использованием циклофосфамида в дозе от или приблизительно от 20 мг/кг до 100 мг/кг, например, от или приблизительно от 40 мг/кг до 80 мг/кг. В определенных аспектах индивидуума предварительно подготавливают с использованием точно или приблизительно 60 мг/кг циклофосфамида. В определенных вариантах осуществления циклофосфамид можно вводить в однократной дозе или можно вводить во множестве доз, например, проводя введение ежесуточно, через сутки или каждые три суток. В определенных вариантах осуществления циклофосфамид вводят раз в сутки в течение одних или двух суток. В определенных вариантах осуществления, где средство для лимфодеплеции содержит циклофосфамид, индивидууму вводят циклофосфамид в дозе от или приблизительно от 100 мг/м² до 500 мг/м², например, от или приблизительно от 200 мг/м² до 400 мг/м² или от 250 мг/м² до 350 мг/м², включительно. В определенных случаях индивидууму вводят приблизительно 300 мг/м² циклофосфамида. В определенных вариантах осуществления циклофосфамид можно вводить в однократной дозе или можно вводить во множестве доз, например, вводимых ежесуточно, через сутки или каждые трое суток. В определенных вариантах осуществления циклофосфамид вводят ежесуточно, например, в течение 1-5 суток, например, в течение периода от 3 до 5 суток. В определенных случаях индивидууму вводят приблизительно 300 мг/м² циклофосфамида, ежесуточно в течение 3 суток до начала клеточной терапии.

[0362] В определенных вариантах осуществления где средство для лимфодеплеции содержит флударабин, индивидууму вводят флударабин в дозе от или приблизительно от 1 мг/м² до 100 мг/м², например, от или приблизительно от 10 мг/м² до 75 мг/м², от 15 мг/м²

до 50 мг/м², от 20 мг/м² до 40 мг/м² или от 24 мг/м² до 35 мг/м², включительно. В определенных случаях индивидууму вводят приблизительно 30 мг/м² флударабина. В определенных вариантах осуществления флударабин можно вводить в однократной дозе или можно вводить во множестве доз, например, вводимых ежесуточно, через сутки или каждые трое суток. В определенных вариантах осуществления флударабин вводят ежесуточно, например, в течение 1-5 суток, например, в течение периода от 3 до 5 суток. В определенных случаях индивидууму вводят приблизительно 30 мг/м² флударабина ежесуточно в течение 3 суток до начала клеточной терапии.

[0363] В определенных вариантах осуществления средство для лимфодеплеции содержит комбинацию средств, такую как комбинация циклофосфида и флударабина. Таким образом, комбинация средств может включать циклофосфид в любой дозе или с любой схемой введения, таких как дозы и схемы введения, описанные выше, и флударабин в любой дозе или с любой схемой введения, таких как дозы и схемы введения описанные выше. Например, в определенных аспектах индивидууму перед первой или последующей дозами вводят 60 мг/кг (~2 г/м²) циклофосфида и от 3 до 5 доз 25 мг/м² флударабина.

[0364] В определенных вариантах осуществления после введения клеток определяют биологическую активность подвергнутых инженерии популяций клеток, например, любым из ряда известных способов. Параметры для оценки включают специфическое связывание подвергнутых инженерии или природных Т-клеток или других иммунных клеток с антигеном *in vivo*, например, посредством визуализации, или *ex vivo*, например, посредством ELISA или проточной цитометрии. В определенных вариантах осуществления способность подвергнутых инженерии клеток разрушать клетки-мишени можно определять любыми известными подходящими способами, такими как анализы цитотоксичности, описанные, например, в Kochenderfer et al., *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009), и Herman et al. *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004). В определенных вариантах осуществления биологическую активность клеток определяют посредством оценки экспрессии и/или секреции одного или нескольких цитокинов, таких как CD107a, IFN γ , IL-2 и TNF. В определенных аспектах биологическую активность определяют посредством оценки клинического исхода, такого как снижение опухолевой массы или нагрузки.

[0365] В определенных вариантах осуществления подвергнутые инженерии клетки дополнительно модифицируют любым количеством способов так, что возрастала их терапевтическая или профилактическая эффективность. Например, подвергнутые инженерии CAR или TCR, экспрессируемые популяцией, можно прямо или опосредовано через линкер конъюгировать с направляющей молекулой. Практическая реализация конъюгации соединений, например, CAR или TCR, с направляющими молекулами известна. См., например, Wadwa et al., *J. Drug Targeting* 3: 111 (1995) и патент США 5087616.

[0366] В определенных вариантах осуществления клетки вводят как часть комбинированной терапии, например, одновременно или последовательно с другой терапевтической интервенцией, такой как антитела или подвергнутые инженерии клетки или рецептор или средство, такое как цитотоксическое или терапевтическое средство, в любом порядке. Клетки в определенных вариантах осуществления вводят совместно с один или несколькими дополнительными терапевтическими средствами или в связи с другой терапевтической интервенцией одновременно или последовательно в любом порядке. В определенных контекстах клетки вводят совместно с другим терапевтическим средством достаточно близко по времени так, что популяции клеток усиливают действие одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, или наоборот. В определенных вариантах осуществления клетки вводят до одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. В определенных вариантах осуществления клетки вводят после одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. В определенных вариантах осуществления одно или несколько дополнительных средств включают цитокин, такой как IL-2, например, для увеличения продолжительности.

D. Мониторинг или оценка терапии терапевтическими композициями Т-клеток

1. Оценка фармакокинетики (РК) подвергнутых инженерии клеток, например, пиковых уровней клеток и показателей у пациентов

[0367] В определенных вариантах осуществления способ включает оценку воздействия, количества, концентрации, продолжительности существования и пролиферации Т-клеток, например, Т-клеток, вводимых при Т-клеточной терапии. В определенных вариантах осуществления способ включает оценку воздействия, количества или уровня подвергнутых инженерии Т-клеток, например, Т-клеток, вводимых при Т-клеточной терапии, или их подмножества, например, CD3⁺-клеток, CD4⁺-клеток, CD8⁺-клеток, CD3⁺ CAR⁺-клеток, CD4⁺ CAR⁺-клеток или CD8⁺ CAR⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления воздействие или пролонгированный рост и/или продолжительность существования клеток, и/или изменения фенотипов клеток, или функциональную активность клеток, например, клеток, вводимых при иммунотерапии, например, Т-клеточной терапии, в способах, предоставляемых в настоящем документе, можно определять посредством оценки характеристик Т-клеток *in vitro* или *ex vivo*. В определенных вариантах осуществления такие анализы можно использовать для определения или подтверждения функции Т-клеток, используемых при иммунотерапии, например, Т-клеточной терапии, до или после проведения клеточной терапии, предоставляемой по настоящему документу.

[0368] В определенных аспектах воздействие, количество, концентрация, продолжительность существования и пролиферация относятся к фармакокинетическим параметрам. В определенных случаях фармакокинетику можно оценивать, определяя такие параметры как максимальная (пиковая) концентрация в плазме ($C_{\max}$), пиковое время (т.е., когда достигается максимальная концентрация в плазме ($C_{\max}$); $T_{\max}$), минимальная концентрация в плазме (т.е., минимальная концентрация в плазме между

дозами терапевтического средства, например, CAR^+ Т-клеток; C_{min}), период полувыведения ($T_{1/2}$) и площадь под кривой (т.е., площадь под кривой, получаемая посредством построения графика зависимости времени и концентрации терапевтического средства CAR^+ Т-клеток в плазме; AUC), после введения. Концентрацию конкретного терапевтического средства, например, CAR^+ Т-клеток, в плазме после введения можно измерять любым известным в данной области способом, подходящим для оценки концентрации терапевтического средства, например, CAR^+ Т-клеток, в образцах крови, или любыми способами, описываемыми в настоящем документе. Например, можно использовать способы на основе определения нуклеиновых кислот, такие как количественная ПЦР (кПЦР), или способы на основе проточной цитометрии, или другие анализы, такие как иммунологические анализы, ELISA или анализы на основе хроматографии/масс-спектрометрии.

[0369] В определенных вариантах осуществления для оценки доступности, например, биодоступности, вводимых клеток определяют фармакокинетику (PK) вводимых клеток, например, композиции CAR^+ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления определяемые фармакокинетические параметры вводимых клеток включают максимальные (пиковые) концентрации в плазме (C_{max}), такие как C_{max} $CD3^+$ CAR^+ -клеток, $CD4^+$ CAR^+ -клеток и или $CD8^+$ CAR^+ Т-клеток; момент времени, в который достигается C_{max} (T_{max}), такой как T_{max} $CD3^+$ CAR^+ -клеток, $CD4^+$ CAR^+ -клеток и или $CD8^+$ CAR^+ Т-клеток, и/или площадь под кривой (AUC), такая как AUC_{0-28} , $CD3^+$ CAR^+ -клеток, $CD4^+$ CAR^+ -клеток и/или $CD8^+$ CAR^+ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления фармакокинетический параметр представляет собой пиковую концентрацию $CD3^+$ CAR^+ Т-клеток (C_{max} $CD3^+$ CAR^+ Т-клеток) или пиковую концентрацию $CD8^+$ CAR^+ Т-клеток (C_{max} $CD8^+$ CAR^+ Т-клеток). В определенных вариантах осуществления фармакокинетический параметр представляет собой AUC_{0-28} $CD3^+$ CAR^+ Т-клеток (AUC_{0-28} $CD3^+$ CAR^+ Т-клеток) или AUC_{0-28} $CD8^+$ CAR^+ Т-клеток (AUC_{0-28} $CD8^+$ CAR^+ Т-клеток).

[0370] В определенных вариантах осуществления "воздействие" может относиться к воздействию терапевтического средства на организм, например, CAR^+ Т-клеток в плазме (крови или сыворотке) после введения терапевтического средства в течение определенного периода времени. В определенных вариантах осуществления воздействие можно указывать как площадь под кривой зависимости концентрации терапевтического средства от времени (AUC), как определяют посредством фармакокинетического анализа после введения дозы терапевтического средства, например, CAR^+ Т-клеток. В определенных случаях AUC выражают в единицах клеток*сутки/мкл для клеток, вводимых при клеточной терапии, или в соответствующих им единицах. В определенных вариантах осуществления AUC измеряют как среднюю AUC в группе пациентов, например, выборочной группе пациентов, например, средняя AUC для одного или нескольких пациентов. В определенных вариантах осуществления системное воздействие относится к площади под кривой (AUC) в пределах определенного периода времени,

например, начиная от суток 0 до суток 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28 суток или более, или до недели 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более, или до месяца 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 48 или более. В определенных вариантах осуществления AUC определяют как AUC начиная от суток 0 до суток 28 (AUC_{0-28}) после введения терапевтического средства, например, CAR⁺ Т-клеток, включая все определяемые данные и данные, экстраполируемые на основе определяемых фармакокинетических (PK) параметров, таких как средняя AUC для группы пациентов, такой как выборочная группа пациентов. В определенных вариантах осуществления для определения воздействия в течение времени, например, AUC в течение определенного периода времени, такой как AUC_{0-28} , кривую зависимости концентрации терапевтического средства от времени получают с использованием нескольких измерений или оценок параметров, например, концентраций клеток, в течение определенного периода времени, например, измерения проводят каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21 или 28 суток или более.

[0371] В определенных вариантах осуществления присутствие и/или количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, экспрессирующих CAR клеток, вводимых при Т-клеточной терапии) у индивидуума детектируют после введения Т-клеток и перед, в течение и/или после введения терапевтического средства. В определенных аспектах для оценки количества клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, экспрессирующих CAR клеток, вводимых при Т-клеточной терапии), в крови, или сыворотке, или органе, или образце ткани (например, участок заболелания, например, образец опухоли) индивидуума используют способы на основе анализа нуклеиновых кислот, такие как количественная ПЦР (кПЦР). В определенных аспектах продолжительность существования количественно определяют как копии ДНК или плазмиды, кодирующей рецептор, например, CAR, на микрограмм ДНК, или как количество экспрессирующих рецептор, например, экспрессирующих CAR, клеток на микролитр образца, например, крови или сыворотки, или на общее количество моноклеарных клеток периферической крови (P BMC), или лейкоцитов, или Т-клеток на микролитр образца. В определенных вариантах осуществления праймеры или зонды, используемые для кПЦР или других способов на основе анализа нуклеиновых кислот специфичны в отношении связывания, распознавания и/или амплификации нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный рецептор, и/или других компонентов или элементов плазмиды и/или вектора, включая регуляторные элементы, например, промоторы, транскрипционные и/или посттранскрипционные регуляторные элементы или элементы отклика, или маркеры, например, суррогатные маркеры. В определенных вариантах осуществления праймеры могут быть специфичными для регуляторных элементов, таких как посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE). В определенных примерах присутствие и/или количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, выражено в виде количества копий последовательности нуклеиновой кислоты (например, трансгенной последовательности),

кодирующей CAR или последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанной с кодирующей CAR последовательностью, на массу ДНК (например, копий/мкг ДНК); AUC для кривой копий/мкг ДНК в течение определенного периода времени, максимального или пикового количества копий/мкг ДНК после лечения, или копий/мкг ДНК на сутки 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, или неделю 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 или более после лечения или его начала.

[0372] В определенных вариантах осуществления клетки детектируют у индивидуума через или по меньшей мере через 4, 14, 15, 27 или 28 суток после введения Т-клеток, например, экспрессирующих CAR Т-клеток. В определенных аспектах клетки детектируют через или по меньшей мере через 2, 4 или 6 недель после, или через 3, 6 или 12, 18 или 24 или 30 или 36 месяцев, или через 1, 2, 3, 4, 5 или более лет после введения Т-клеток, например, экспрессирующих CAR Т-клеток.

[0373] В определенных вариантах осуществления пиковые уровни и/или AUC оценивают и/или образец получают у индивидуума за один раз, т.е. по меньшей мере через 8 суток, 9 суток, 10 суток, 11 суток, 12 суток, 13 суток, 14 суток, 15 суток, 16 суток, 17 суток, 18 суток, 19 суток, 20 суток или 21 сутки после начала введения подвергнутых генетической инженерии клеток. В определенных вариантах осуществления пиковые уровни и/или AUC оценивают и/или образец получают у индивидуума за один раз, т.е. через период времени от или приблизительно от 11 до 22 суток, от 12 до 18 суток или от 14 до 16 суток, каждое включительно, после начала введения подвергнутых генетической инженерии клеток.

[0374] Воздействие, например, количество или концентрация клеток, например, Т-клеток, вводимых при Т-клеточной терапии, указывающий на рост и/или продолжительность, можно указывать в терминах максимального количества или концентрации клеток, которые воздействуют на индивидуума, продолжительности существования детектируемых клеток или клеток выше определенного количества или процентного содержания, площади под кривой (AUC) для количества или концентрации клеток в течение определенного периода времени и/или их сочетания и их показателей. Такие результаты можно оценивать с применением известных способов, таких как кПЦР для детекции количества копий нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, по сравнению с общим количеством нуклеиновой кислоты или ДНК в конкретном образце, например, крови, сыворотки, плазмы или ткани, таком как образец опухоли, и/или анализы посредством проточной цитометрии с детекцией клеток, экспрессирующих рецептор, как правило, с использованием антител, специфичных к рецепторам. Также для детекции количества, или процентного содержания, или концентрации функциональных клеток, таких как клетки, способные к связыванию клеток, обуславливающих заболевание или патологическое состояние или экспрессирующих антиген, распознаваемый рецептором, и/или нейтрализующие их, и/или индуцирующие ответы, например, цитотоксические ответы, против них, можно использовать клеточные анализы.

[0375] В определенных аспектах увеличенное воздействие на индивидуума клеток включает увеличенный рост клеток. В определенных вариантах осуществления, после введения Т-клеток, например, экспрессирующих CAR Т-клеток, у индивидуума происходит рост количества экспрессирующих рецептор клеток, например, экспрессирующих CAR клеток.

[0376] В определенных вариантах осуществления клетки, экспрессирующие рецептор детектируют в сыворотке, плазме, крови или ткани, например, в образце опухоли индивидуума, например, указанным способом, таким как способ детекции на основе кПЦР или проточной цитометрии, по меньшей мере через 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 или более суток после введения Т-клеток, например, экспрессирующих CAR Т-клеток, в течение по меньшей мере или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 или более недель после введения Т-клеток, например, экспрессирующих CAR Т-клеток.

[0377] В определенных аспектах у индивидуума или в его жидкостях, плазме, сыворотке, ткани или ее компартменте, например, в крови, например, периферической крови или в участке заболевания, например, опухоли, детектируют или присутствуют по меньшей мере или приблизительно 1×10^2 , по меньшей мере или приблизительно 1×10^3 , по меньшей мере или приблизительно 1×10^4 , по меньшей мере или приблизительно 1×10^5 , или по меньшей мере или приблизительно 1×10^6 , или по меньшей мере или приблизительно 5×10^6 , или по меньшей мере или приблизительно 1×10^7 , или по меньшей мере или приблизительно 5×10^7 , или по меньшей мере или приблизительно 1×10^8 экспрессирующих рекомбинантный рецептор, например, экспрессирующих CAR клеток, и/или по меньшей мере 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 или 500 или 1000 экспрессирующих рецептор клеток на миллилитр, например, по меньшей мере 10 на миллилитр. В определенных вариантах осуществления такое количество или концентрацию клеток у индивидуума детектируют в течение по меньшей мере или приблизительно 20 суток, по меньшей мере или приблизительно 40 суток, или по меньшей мере или приблизительно 60 суток, или по меньшей мере или приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 2 или 3 лет после введения Т-клеток, например, экспрессирующих CAR Т-клеток. Такие количества клеток можно детектировать способами на основе проточной цитометрии или количественной ПЦР и экстраполировать известными способами на общие количества клеток. См., например, Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177), Park et al, *Molecular Therapy* 15(4):825-833 (2007), Savoldo et al., *JCI* 121(5):1822-1826 (2011), Davila et al., (2013) *PLoS ONE* 8(4):e61338, Davila et al., *Oncoimmunology* 1(9):1577-1583 (2012), Lamers, *Blood* 2011 117:72-82, Jensen et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 2010 September; 16(9): 1245-1256, Brentjens et al., *Blood* 2011 118(18):4817-4828.

[0378] В определенных аспектах количество копий нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, например, количество копий вектора на 100

клеток, например, в периферической крови или костном мозге или другом компартменте, как измеряют иммуногистохимическими способами, ПЦР и/или посредством проточной цитометрии, составляет по меньшей мере 0,01, по меньшей мере 0,1, по меньшей мере 1 или по меньшей мере 10, приблизительно через 1 неделю, приблизительно через 2 недели, приблизительно через 3 недели, приблизительно через 4 недели, приблизительно через 5 недель, или по меньшей мере приблизительно через 6 недель или по меньшей мере приблизительно через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или по меньшей мере через 2 или 3 года после введения клеток, например, экспрессирующих CAR T-клеток. В определенных вариантах осуществления количество копий вектора, экспрессирующего рецептор, например, CAR, на микрограмм геномной ДНК составляет по меньшей мере 100, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 5000, или по меньшей мере 10000, или по меньшей мере 15000 или по меньшей мере 20000 одновременно приблизительно через 1 неделю, приблизительно через 2 недели, приблизительно через 3 недели или по меньшей мере приблизительно через 4 недели после введения T-клеток, например, экспрессирующих CAR T-клеток, или по меньшей мере через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или по меньшей мере через 2 или 3 года после такого введения.

[0379] В определенных аспектах рецептор, например, CAR, экспрессируемый клетками, детектируют посредством количественной ПЦР (кПЦР) или посредством проточной цитометрии у индивидуума, в плазме, сыворотке, крови, ткани и/или его участке заболевания, например, участке опухоли, один раз, т.е. по меньшей мере или приблизительно через 3 месяца, по меньшей мере или приблизительно через 6 месяцев, по меньшей мере или приблизительно через 12 месяцев, по меньшей мере или приблизительно через 1 год, по меньшей мере или приблизительно через 2 года, по меньшей мере или приблизительно 3 лет или более 3 лет после введения клеток, например, после начала введения T-клеток. В определенных вариантах осуществления определяют площадь под кривой (AUC) для концентрации экспрессирующих рецептор (например, CAR) клеток в жидкостях, плазме, сыворотке, крови, ткани, органе и/или участке заболевания, например, участке опухоли индивидуума в течение определенного периода времени после введения T-клеток, например, экспрессирующих CAR T-клеток.

[0380] Также предоставлены способы оценки вероятности ответа или длительного ответа. В определенных вариантах осуществления способы включают детекцию в биологическом образце, полученном у индивидуума, пиковых уровней одного или нескольких воспалительных маркеров и/или пиковых уровней подвергнутых генетической инженерии клеток, содержащих T-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), где индивидуум ранее введена доза подвергнутых генетической инженерии клеток для лечения заболевания или патологического состояния. В определенных вариантах осуществления способы включают индивидуальное сравнение пиковых уровней с пороговым значением, таким образом, определяя вероятность того, что индивидуум достигнет длительного ответа на введение подвергнутых генетической инженерии клеток.

[0381] В определенных вариантах осуществления у индивидуума с большой вероятностью достигается ответ или длительный ответ, если пиковые уровни одного или нескольких воспалительных маркеров находится ниже порогового значения, и у индивидуума длительный ответ достигается с малой вероятностью, если пиковые уровни одного или нескольких воспалительных маркеров находятся выше порогового значения. В определенных вариантах осуществления у индивидуума с большой вероятностью достигается длительный ответ, если пиковый уровень подвергнутых генетической инженерии клеток находится в пределах терапевтического диапазона между нижнего порогового значения и верхнего порогового значения, и у индивидуума длительный ответ достигается с малой вероятностью, если пиковый уровень подвергнутых генетической инженерии клеток находится ниже нижнего порогового значения или находится выше верхнего порогового значения.

[0382] В определенных случаях предоставляемые варианты осуществления включают оценку таких параметров, как признаки, факторы, характеристики пациента и/или заболевания или патологического состояния и/или экспрессия биомаркеров. В определенных вариантах осуществления оцениваемые параметры ассоциированы и/или коррелированы с фармакокинетическими параметрами, ответом, длительным ответом и/или развитием токсичности. В определенных вариантах осуществления параметры включают показатели пациентов или признаки пациентов. В определенных вариантах осуществления оцениваемые параметры коррелируют с фенотипом клеток композиции, описываемых в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления оцениваемые параметры указывают будет ли выходящая композиция иметь необходимый клеточный состав (например, процентное содержание фенотипов клеток), коррелируемый с продолжительностью жизни без прогрессирования и/или длительным ответом. В определенных вариантах осуществления оцениваемые параметры можно использовать для прогноза вероятности получения выходящей композиции, пригодной для терапевтического введения. В определенных вариантах осуществления для пациентов с высокой тяжестью заболевания, например, пациентов с большой SPD (например, значением, превышающим или равным 50 cm^2) или значениями CRP (например, значением большим или равным 20 mg/l), выходящие композиции, пригодные для терапевтического введения можно получить с меньшей вероятностью. В определенных вариантах осуществления для пациентов с низкой тяжестью заболевания, например, пациентов с небольшой SPD (например, значением менее 50 cm^2) или значениями CRP (например, значение менее 20 mg/l), выходящие композиции, пригодные для терапевтического введения можно получить с большей вероятностью. В определенных вариантах осуществления параметры включают признаки, факторы, характеристики заболевания или патологического состояния. В определенных вариантах осуществления параметры оценивают до лечения, например, до введения клеточного терапевтического средства. В определенных вариантах осуществления параметры оценивают после лечения, например, после введения одной или нескольких доз клеточного терапевтического средства.

[0383] В определенных вариантах осуществления параметр представляет собой или включает фармакокинетические параметры, например, максимальную (пиковую) концентрацию в плазме ($C_{\max}$), пиковое время (т.е., когда достигается максимальная концентрация в плазме ($C_{\max}$); $T_{\max}$), минимальную концентрацию в плазме (т.е., минимальная концентрация в плазме между дозами терапевтического средства, например, CAR⁺ Т-клетки; $C_{\min}$), период полувыведения ($T_{1/2}$) и площадь под кривой (т.е., площадь под кривой, получаемую посредством построения графика зависимости времени и концентрации в плазме терапевтического средства CAR⁺ Т-клетки; AUC, такую как AUC₀₋₂₈).

[0384] В определенных вариантах осуществления параметр представляет собой или содержит один или несколько факторов, указывающих на состояние пациента и/или заболевания или патологического состояния пациента. В определенных вариантах осуществления параметр является показателем опухолевой нагрузки. В определенных вариантах осуществления признак, указывающий на опухолевую нагрузку, представляет собой волюметрический показатель опухоли(ей). В определенных вариантах осуществления волюметрический показатель представляет собой меру очага(ов) поражения, такую как размер опухоли, диаметр опухоли, объем опухоли, масса опухоли, опухолевая нагрузка или величина опухоли, связанный с опухолью отек, связанный с опухолью некроз и/или количество или степень метастазирования. В определенных вариантах осуществления волюметрический показатель опухоли представляет собой двухмерную меру. Например, в определенных вариантах осуществления площадь очага(ов) поражения рассчитывают как произведение наибольшего диаметра и наибольшего перпендикулярного диаметра из всех измеряемых опухолей. В определенных случаях волюметрический показатель опухоли представляет собой одномерную меру. В определенных случаях размер измеримых очагов поражения оценивают как наибольший диаметр. В определенных вариантах осуществления определяют сумму произведений диаметров (SPD), наибольшие диаметры опухолей (LD), сумму наибольших диаметров опухолей (SLD), некроз, объем опухоли, объем некроза, отношение некроз-опухоль (NTR), околоопухолевый отек (PTE) и отношение отек-опухоль (ETR).

[0385] Иллюстративные способы для определения и оценки опухолевой нагрузки включают способы, описанные, например, в Carceller et al., *Pediatr Blood Cancer*. (2016) 63(8):1400-1406 и Eisenhauer et al., *Eur J Cancer*. (2009) 45(2):228-247. В определенных вариантах осуществления волюметрическим показателем является сумма произведений диаметров (SPD), измеряемая посредством определения суммы произведений наибольших перпендикулярных диаметров всех измеримых опухолей. В определенных аспектах опухоль или очаг поражения определяют в одном измерении по наибольшему диаметру (LD) и/или посредством определения суммы наибольших диаметров опухолей (SLD) всех измеряемых очагов поражения. В определенных вариантах осуществления волюметрическим показателем опухоли является количественный волюметрический

анализ некроза опухоли, например, объема некроза и/или отношение некроз-опухоль (NTR), см. Monsky et al., *Anticancer Res.* (2012) 32(11): 4951-4961. В определенных аспектах волюметрическим показателем опухоли является количественный волюметрический анализ связанного с опухолью отека, такого как околоопухолевый отек (PTE) и/или отношения отек-опухоль (ETR). В определенных вариантах осуществления определение можно проводить способами визуализации, такими как компьютерная томография (СТ), позитронно-эмиссионная томография (PET), и/или магнитно-резонансная томография (MRI) индивидуума.

[0386] В определенных вариантах осуществления волюметрическим показателем является SPD, и в определенных случаях со значением SPD, которое находится выше порогового значения, коррелировано развитие токсичности, например, CRS или NT. В определенных вариантах осуществления волюметрическим показателем является SPD, и пороговое значение составляет или приблизительно составляет 30 см^2 , составляет или приблизительно составляет 40 см^2 , составляет или приблизительно составляет 50 см^2 , составляет или приблизительно составляет 60 см^2 , или составляет или приблизительно составляет 70 см^2 . В определенных вариантах осуществления волюметрическим показателем является SPD, и пороговое значение составляет или приблизительно составляет 30 см^2 , составляет или приблизительно составляет 40 см^2 , составляет или приблизительно составляет 50 см^2 , составляет или приблизительно составляет 60 см^2 , или составляет или приблизительно составляет 70 см^2 .

[0387] В определенных вариантах осуществления волюметрический показатель опухоли определяют на сеансе скрининга, таком как плановый осмотр или забор крови для подтверждения и/или идентификации патологического состояния или заболевания у индивидуума.

[0388] В определенных аспектах параметр, например, определения опухолевой нагрузки, коррелирует и/или ассоциирован с фармакокинетическими параметрами. В определенных вариантах осуществления параметр, включающий фармакокинетические параметры, ассоциирован с ответом и/или длительным ответом, и/или риском развития токсичности, например, CRS или нейротоксичности (NT).

[0389] В определенных вариантах осуществления параметр представляет собой или включает по меньшей мере один или панель биомаркеров. В определенных вариантах осуществления экспрессия и/или присутствие биомаркера ассоциированы с и/или коррелируют с фармакокинетическими параметрами, ответом, длительным ответом и/или развитием токсичности. В определенных вариантах осуществления параметр сравнивают с конкретным эталонным значением, например, значениями, ассоциированными с ответом и/или длительным ответом и/или с риском развития токсичности, например, CRS или нейротоксичности (NT). В определенных вариантах осуществления способы также включают введение индивидууму средства, способного к модуляции роста, пролиферации и/или активности CAR⁺ Т-клеток, на основе оценки присутствующих у пациента факторов и/или биомаркеров.

[0390] В определенных аспектах варианты осуществления включают получение биологического образца для детекции параметра и/или оценки присутствия и/или детекции параметра. В определенных вариантах осуществления биологический образец получают, как правило, в пределах периода от 4 часов до 12 месяцев после введения клеточного терапевтического средства или его первого введения или дозы, или после начала любого из указанных выше, например, как правило, в пределах или приблизительно в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 30, 60 или 90 или более суток, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более недель или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 48 или более месяцев после введения клеточного терапевтического средства или его первого введения или дозы или после начала любого из указанного выше. В определенных вариантах осуществления параметр оценивают или измеряют у индивидуума до введения клеточного терапевтического средства или soon после введения клеточного терапевтического средства или его первого введения или дозы или после начала любого из указанного выше, так как как правило в пределах 4 часов до 3 суток введения клеточного терапевтического средства или его первого введения или дозы или после начала любого из указанного выше, так как как правило в пределах или приблизительно 1 сутки, 2 суток или 3 суток после введения клеточного терапевтического средства или его первого введения или дозы или после начала любого из указанного выше. В определенных вариантах осуществления параметр оценивают или измеряют. В определенных вариантах осуществления параметр оценивают как правило в пределах 4 часов до 12 месяцев введения клеточного терапевтического средства или его первого введения или дозы или после начала любого из указанного выше, так как как правило в пределах или в пределах приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 30, 60 или 90 или более суток, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более недели, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 48 или более месяцы, после введения клеточного терапевтического средства или его первого введения или дозы или после начала любого из указанного выше.

[0391] В определенных аспектах параметр, например, присутствующий у пациента фактор и/или биомаркер, коррелирует и/или ассоциирован с фармакокинетическими параметрами. В определенных вариантах осуществления параметр, включая фармакокинетические параметры, ассоциирован с ответом и/или длительным ответом и/или риском развития токсичности, например, CRS или нейротоксичности (NT).

[0392] В определенных вариантах осуществления параметр представляет собой биомаркер. В определенных вариантах осуществления параметр представляет собой или включает экспрессию биомаркера и/или количество, концентрацию и/или процентное содержание клеток, которые экспрессируют конкретный биомаркер. В определенных вариантах осуществления параметр включает биомаркеры или каждый биомаркер в панели, которая содержит множество биомаркеров. В определенных вариантах осуществления биомаркер представляет собой или включает цитокин и/или другое составляющее сыворотки или крови, например, любое из описанного в настоящем

документе. В определенных вариантах осуществления биомаркер или каждый биомаркер в панели представляет собой цитокин, который в определенных случаях может представлять собой хемокин. В определенных вариантах осуществления биомаркеры или каждый биомаркер в панели включают растворимый рецептор. В определенных вариантах осуществления биомаркеры или каждый биомаркер в панели включают растворимый сывороточный белок. Иллюстративные биомаркеры или панель биомаркеров описаны в настоящем документе.

[0393] В определенных вариантах осуществления параметр представляет собой или включает уровни и/или концентрации в крови анализируемого вещества. В определенных вариантах осуществления параметр представляет собой или включает уровни и/или концентрации воспалительного маркера. В определенных вариантах осуществления анализируемое вещество и/или воспалительный маркер в крови представляют собой или включают уровни и/или концентрации интерлейкина-7 (IL-7), IL-15, воспалительного белка макрофагов (MIP-1 α). В определенных вариантах осуществления анализируемое вещество и/или воспалительный маркер в крови представляют собой или включают уровни и/или концентрации IL-6, IL-10, IL-16, интерферона гамма (IFN- γ), фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), MIP-1 α , MIP-1 β , белок хемотаксиса моноцитов-1 (MCP-1) и хемокин с мотивом C-X-C 10 (CXCL10). В определенных вариантах осуществления анализируемое вещество и/или воспалительный маркер в крови представляют собой или включают уровни и/или концентрации ферритина, С-реактивного белка (CRP), D-димера (продукта разрушения фибрина), IL-6, IL-10, IL-15, IL-16, TNF- α , MIP-1 α , и MIP-1 β . В определенных вариантах осуществления анализируемое вещество и/или воспалительный маркер в крови представляют собой или включают уровни и/или концентрации LDH, ферритина, CRP, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- α 2, MCP-1 и/или MIP-1 β . В определенных вариантах осуществления анализируемое вещество и/или воспалительный маркер в крови представляют собой или включают уровни и/или концентрации CRP, сывороточного амилоида A1 (SAA-1), IL-2, IL-6, IL-10, IL-15, TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, CXCL10 и лиганда хемокинов с мотивом C-C 13 (CCL13). В определенных вариантах осуществления анализируемое вещество и/или воспалительный маркер в крови представляют собой или включают уровни и/или концентрации LDH, ферритина, CRP, D-димера, SAA-1, IL-6, IL-10, IL-15, IL-16, TNF- α , IFN- γ и/или MIP-1 α .

[0394] В определенных вариантах осуществления детектируют и оценивают воспалительный маркер, который представляет собой или включает уровень или присутствие С-реактивного белка (CRP), определенной скорости оседания эритроцитов (СОЭ), альбумина, ферритина, β 2 микроглобулина (β 2-M) или лактатдегидрогеназы (LDH). В определенных вариантах осуществления воспалительный маркер оценивают с использованием иммунного анализа. Например, для детекции воспалительного маркера можно использовать твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), ферментный иммунологический анализ (EIA), радиоиммунологический анализ (RIA), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), вестерн-блоттинг, хроматографический анализ,

иммуногистохимию, белковый чип или иммуно-ПЦР (iPCR). В определенных вариантах осуществления использование промышленных изделий включают детекцию воспалительного маркера, указывающего на опухолевую нагрузку. В определенных случаях оценку или оценку воспалительного маркера проводят с использованием проточной цитометрии. В определенных случаях реагент представляет собой растворимый белок, который связывает воспалительный маркер. В определенном примере реагент представляет собой белок, который связывает С-реактивный белок (CRP), скорость оседания эритроцитов (СОЭ), альбумин, ферритин, $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2$ -М) или лактатдегидрогеназа (LDH).

[0395] В определенных вариантах осуществления биомаркер, например, воспалительный маркер, представляет собой или содержит С-реактивный белок (CRP). В определенных вариантах осуществления CRP оценивают с использованием твердофазного иммуноферментного анализа *in vitro* с получением количественного определения CRP человека из такого образца, как сыворотка, плазма или кровь. В определенных примерах CRP детектируют с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) для человека. В определенных вариантах осуществления биомаркер, например, воспалительный маркер представляет собой или включает скорость оседания эритроцитов (СОЭ). В определенных вариантах осуществления СОЭ оценивают, определяя расстояние (в миллиметрах в час), на которое падают эритроциты после отделения от плазмы в вертикальной пипетке или пробирке. В определенных вариантах осуществления биомаркер представляет собой или включает альбумин. В определенных аспектах альбумин оценивают с использованием колориметрического анализа или твердофазного иммуноферментного анализа *in vitro*. В определенных примерах альбумин детектируют с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) для человека. В определенных вариантах осуществления биомаркер, например, воспалительный маркер, представляет собой или включает ферритин или $\beta 2$ микроглобулин. В определенных вариантах осуществления ферритин или $\beta 2$ микроглобулин оценивают с использованием иммунологического анализа или детектируют с использованием ELISA. В определенных аспектах биомаркер, например, воспалительный маркер, представляет собой или включает лактатдегидрогеназу (LDH), и LDH оценивают с использованием колориметрического анализа или ап твердофазного иммуноферментного анализа *in vitro*.

[0396] В определенных вариантах осуществления параметр представляет собой LDH, и в определенных случаях развитие токсичности, например, CRS или NT, коррелирует со значением LDH, которое находится выше пороговое значение. В определенных вариантах осуществления воспалительный маркер представляет собой LDH, и пороговое значение составляет или приблизительно составляет 300 единиц на литр, составляет или приблизительно составляет 400 единиц на литр, составляет или приблизительно составляет 500 единиц на литр или составляет или приблизительно составляет 600 единиц на литр.

[0397] В определенных вариантах осуществления параметр или биомаркер представляет собой LDH. В определенных вариантах осуществления биомаркер представляет собой LDH, а пороговое значение представляет собой 500 Ед/л или более. В определенных вариантах осуществления параметр или биомаркер представляет собой SPD. В определенных вариантах осуществления параметр представляет собой SPD, а пороговое значение составляет или приблизительно составляет 50 см² или более. В определенных вариантах осуществления биомаркер или параметры представляют собой SPD и LDH, а пороговые значения представляют собой SPD 50 см² или более и LDH 500 Ед/л или более. В определенных вариантах осуществления биомаркеры или параметры ассоциированы с повышенным риском развития CRS или NT. В определенных вариантах осуществления определенные параметр или маркер, которые находятся выше порогового значения, например, SPD 50 см² или более и LDH 500 Ед/л или более, ассоциированы приблизительно с 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-кратным или более повышением риска развития CRS или NT, например, любой степенью CRS или NT. В определенных вариантах осуществления определенные параметр или маркер, которые находятся ниже порогового значения, например, SPD ниже 50 см² и LDH ниже 500 Ед/л, ассоциированы приблизительно с 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-кратным или более снижением риска развития CRS или NT, например, любой степени CRS или NT.

2. Оценка ответа, эффективности и выживаемости

[0398] В определенных аспектах способы включают определение ассоциации или зависимости между дозой клеток с конкретным фенотипом, например, CCR7⁺-клеток, и ответом, эффективностью и/или продолжительностью жизни индивидуумов, которым вводят такие дозы клеток.

[0399] В определенных аспектах уровни ответа у индивидуумов, таких как индивидуумы с NHL, основаны на критерии Лугано. (Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5). В определенных аспектах при оценке ответа используют любой из клинических, гематологических и/или молекулярных способов. В определенных аспектах ответ оцениваемый с использованием критериев Лугано, включает применение позитронно-эмиссионной томографии (PET)-компьютерной томографии (СТ) и/или СТ при необходимости. Оценки PET-СТ могут дополнительно включать применение фтордезоксиглюкозы (FDG) для лимфом с накоплением FDG. В определенных аспектах, где PET-СТ используют для оценки ответа в гистологических образцах с накоплением FDG, можно использовать 5-балльную шкалу. В определенных вариантах 5-балльная шкала содержит следующие критерии: 1, отсутствие захвата выше фонового уровня; 2, захват $\leq$ средостения; 3, захват $>$ средостения но $\leq$ печени; 4, захват умеренный $>$ печень; 5, захват значительно больше, чем у печени и/или новые очаги поражения; X, новые области захвата вероятно не связанные с лимфомой.

[0400] В определенных аспектах полный ответ (CR), как описано с использованием критериев Лугано, включает полный метаболический ответ и полный радиологический

ответ в различных измеряемых участках. В определенных аспектах эти участки включают лимфоузлы и внелимфатические участки, где CR описан как балл 1, 2 или 3 с остаточной массой по 5-балльной шкале или без нее, когда используют PET-СТ. В определенных аспектах в кольце Вальдейера или внеузловых участках с высоким физиологическим захватом или с активацией в селезенке или костном мозге (например, при использовании химиотерапии или миелоидных колониестимулирующих факторов), захват может превышать нормальный для средостения и/или печени. В этих случаях полный метаболический ответ можно предполагать, если захват в изначально включаемых участках составляет не более чем в окружающей нормальной ткани, даже если у ткани существует высокий физиологический захват. В определенных аспектах ответ оценивают в лимфоузлах с использованием СТ, где CR описан как отсутствие внелимфатических участков заболевания и обязательное уменьшение наблюдаемых узлов/масс узлов до $\leq 1,5$ см в наибольшем поперечном диаметре узла (LDi). Дополнительно участки оценивания включают костный мозг, где оценка на основе PET-СТ должна демонстрировать отсутствие свидетельств заболевания с накоплением FDG в костном мозге и оценка на основе СТ должна демонстрировать нормальную морфологию, которая в случае неопределенности должна быть негативна при ИНС. Дополнительно участки могут включать оценку увеличения органов, которая должна снизиться до нормальной. В определенных аспектах оценивают неопределенные очаги поражения и новые очаги поражения, которые в случае CR должны отсутствовать (Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5).

[0401] В определенных аспектах частичный ответ (PR), как описано с использованием критерии Лугано, включает частичный метаболический и/или радиологический ответ в различных измеряемых участках. В определенных аспектах эти участки включают лимфоузлы и внелимфатические участки, где PR описан как балл 4 или 5 со сниженным захватом по сравнению с исходным уровнем и остаточной массой(ами) любого размера, когда используют PET-СТ. В качестве промежуточных такие результаты могут указывать на реагирующее заболевание. В конце лечения такие результаты могут указывать на остаточное заболевание. В определенных аспектах ответ оценивают в лимфоузлах с использованием СТ, где PR описан как $\geq 50\%$ снижение SPD в заданных измеряемых узлах и внеузловых участках в количестве до 6. Если очаг поражения слишком мал для оценки посредством СТ, значение по умолчанию считают 5 мм $\times$ 5 мм; если очаг поражения более не виден, то значение составляет 0 мм $\times$ 0 мм; для узла > 5 мм $\times$ 5 мм, но меньшего, чем средний, для расчета используют фактические замеры. Дополнительно участки оценивания включают костный мозг, где оценка на основе PET-СТ должна демонстрировать остаточный захват, больший чем захват в нормальном костном мозге, но сниженный захват по сравнению с исходным уровнем (диффузный захват, совместимый с реактивными изменениями после разрешенной химиотерапии). В определенных аспектах, если существуют постоянные очаговые изменения в костном

мозге в рамках ответа узла, следует рассмотреть возможность дополнительной оценки с использованием МРТ, или биопсии, или интервального сканирования. В определенных аспектах дополнительные участки могут включать оценку увеличения органа, где селезенка должна уменьшаться на $>50\%$ в длину по сравнению с нормой. В определенных аспектах оценивают неопределенные очаги поражения и новые очаги поражения, которые в случае PR должны отсутствовать/быть нормальными, уменьшаться, но не увеличиваться. Отсутствие ответа/стабильное заболевание (SD) или прогрессирующее заболевание (PD) также можно определять с использованием оценки на основе PET-СТ и/или СТ. (Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5).

[0402] В определенных аспектах продолжительность жизни без прогрессирования (PFS) описана как период времени в течение и после лечения заболевания, такого как злокачественная опухоль, в течение которого индивидуум продолжает жить с заболеванием, но оно не ухудшается. В определенных аспектах объективный ответ (OR) описан как измеряемый ответ. В определенных аспектах частота объективного ответа (ORR) описана как доля пациентов, у которых достигают CR или PR. В определенных аспектах общая продолжительность жизни (OS) описана как период времени от даты диагноза или начала лечения заболевания, такого как злокачественная опухоль, в течение которого индивидуумы с диагностированным заболеванием остаются живыми. В определенных аспектах бессобытийная продолжительность жизни (EFS) описана как период времени после окончания лечения злокачественной опухоли, в течение которого у индивидуума не наблюдают определенных осложнений или событий, которые лечение предназначено предотвращать или лечить. Эти события могут включать рецидив злокачественной опухоли или начало определенных симптомов, таких как боль в костях вследствие злокачественной опухоли, которая распространяется в кость, или гибель.

[0403] В определенных вариантах осуществления мера длительности ответа (DOR) включает время от документирования ответа опухоли до начала прогрессирования заболевания. В определенных вариантах осуществления параметр для оценки ответа может включать длительный ответ, например, ответ, который продолжается после определенного периода времени от начала терапии. В определенных вариантах осуществления длительный ответ характеризуют долей ответа приблизительно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 или 24 месяцев после начала терапии. В определенных вариантах осуществления ответ длится в течение периода более 3 месяцев или более 6 месяцев.

[0404] В определенных аспектах для определения объективного ответа опухоли используют критерии RECIST; в определенных аспектах для солидных опухолей. (Eisenhauer et al., European Journal of Cancer 45 (2009) 228-247.) В определенных аспектах критерии RECIST используют для определения объективного ответа опухоли для наблюдаемых очагов поражения. В определенных аспектах полный ответ, как определяют с использованием критериев RECIST, описан как исчезновение всех наблюдаемых очагов

поражения, и у любых патологических лимфоузлов (наблюдаемых или ненаблюдаемых) должно наблюдаться уменьшение короткой оси до <10 мм. В других аспектах частичный ответ, как определяют с использованием критерии RECIST описан как по меньшей мере 30% уменьшение суммы диаметров наблюдаемых очагов поражения, беря в качестве исходной точки исходную сумму диаметров. В других аспектах прогрессирующее заболевание (PD) описано как по меньшей мере 20% увеличение суммы диаметров наблюдаемых очагов поражения, беря в качестве исходной точки наименьшую сумму в период исследования (это включает сумму на исходном уровне, если она была наименьшей в период исследования). В дополнение к относительному увеличению на 20%, сумма также должна демонстрировать абсолютное увеличение по меньшей мере на 5 мм (в определенных аспектах появление одного или нескольких новых очагов поражения также рассматривают как прогрессирование). В других аспектах стабильное заболевание (SD) описано как недостаточное снижение для квалификации как PR и при этом недостаточное увеличение для квалификации как PD, беря в качестве исходной точки наименьшую сумму диаметров в ходе исследования.

[0405] В определенных аспектах введение предоставляемыми способами и/или с использованием предоставляемых промышленных изделий или композиций, как правило уменьшает или предотвращает развитие или тяжесть заболевания или патологического состояния у индивидуума. Например, когда заболевание или патологическое состояние представляет собой опухоль, как правило, предоставляемыми способами уменьшают размер, объем опухоли, метастазирование, процентное содержание бластов в костном мозге или детектируемую молекулярными способами злокачественную опухоль и/или улучшают прогноз или продолжительность жизни или другой симптом, ассоциированный с опухолевой нагрузкой.

[0406] Тяжесть заболевания может включать общее количество обуславливающих заболевание клеток у индивидуума или в органе, ткани или физиологических жидкостях индивидуума, таких как орган или ткань опухоли или другое место, например, которое могло бы указывать на метастазирование. Например, при определенных гемобластозах опухолевые клетки можно детектировать и/или количественно определять в крови или костном мозге. В определенных вариантах осуществления тяжесть заболевания может включать массу опухоли, количество или степень метастазирования и/или процентное содержание бластных клеток в костном мозге.

[0407] В определенных вариантах осуществления у индивидуума диагностирован лейкоз. Степень тяжести заболевания можно определять посредством оценки остаточного лейкоза в крови или костном мозге.

[0408] В определенных аспектах доли ответа у индивидуумов, таких как индивидуумы с CLL, основаны на критериях ответа, установленных на международном семинаре по хроническому лимфоцитарному лейкозу (IWCLL) (Hallek, et al., Blood 2008, Jun 15; 111(12): 5446-5456). В определенных аспектах эти критерии описаны следующим образом: полная ремиссия (CR), для которой в определенных аспектах необходимы

отсутствие клональных лимфоцитов периферической крови при иммунофенотипировании, отсутствие лимфаденопатии, отсутствие гепатомегалии или спленомегалии, отсутствие системных симптомов и удовлетворительная формула крови; полная ремиссия с неполным восстановлением костного мозга (CRi), которая в определенных аспектах описан как CR выше, но без нормальной формулы крови; частичная ремиссия (PR), которая в определенных аспектах описана как $\geq 50\%$ снижение числа лимфоцитов, $\geq 50\%$ снижение лимфаденопатии или $\geq 50\%$ уменьшение печени или селезенки, вместе с улучшением формулы периферической крови; прогрессирующее заболевание (PD), которое в определенных аспектах описано как $\geq 50\%$ увеличение числа лимфоцитов до $> 5 \times 10^9/\text{л}$, $\geq 50\%$ увеличение лимфаденопатии, $\geq 50\%$ увеличение размера печени или селезенки, трансформация Рихтера или новая цитопения вследствие CLL; и стабильное заболевание, которое в определенных аспектах описано как не удовлетворяющее критериями для CR, CRi, PR или PD.

[0409] В определенных вариантах осуществления индивидуум после введения клеточного терапевтического средства, содержащего одну или более стандартных доз (или стандартную дозу) клеток композиции демонстрирует длительный ответ. В определенных вариантах осуществления длительный ответ представляет собой период времени, как правило, в месяцах, в течение которого индивидуум в результате лечения демонстрирует частичный или полный ответ. В определенных вариантах осуществления длительный ответ соответствует увеличению общей продолжительности жизни.

[0410] В определенных вариантах осуществления индивидуум после введения клеточного терапевтического средства, содержащего одну или более стандартных доз (или стандартная доза) клеток композиции демонстрирует продолжительность жизни без прогрессирования (PFS). В определенных вариантах осуществления продолжительность жизни без прогрессирования определяют, измеряя период времени после лечения или начала лечения (например, после введения клеточного терапевтического средства, содержащего одну или более стандартных доз (или стандартную дозу) клеток композиции), когда заболевание не развивается. В определенных вариантах осуществления, когда заболевание представляет собой злокачественную опухоль, продолжительность жизни без прогрессирования относится к злокачественной опухоли, которая не развивается и не распространяется. В определенных вариантах осуществления продолжительность жизни без прогрессирования соответствует длительному ответу.

[0411] В определенных вариантах осуществления индивидуумы демонстрируют CR или OR, если в пределах 1 месяца после введения дозы клеток, размер лимфоузлов индивидуума составляют менее чем точно или приблизительно 20 мм, менее чем точно или приблизительно 10 мм или менее чем точно или приблизительно 10 мм.

[0412] В определенных вариантах осуществления в костном мозге индивидуума (или в костном мозге более 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более индивидуумов), подвергаемого лечению предоставляемыми способами, индексный клон CLL не детектируют. В определенных вариантах осуществления индексный клон CLL оценивают

посредством глубокого секвенирования IgH. В определенных вариантах осуществления индексный клон не детектируют в момент времени, который представляет собой точно или приблизительно или по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 или 24 месяцев после введения клеток.

[0413] В определенных вариантах осуществления индивидуум демонстрирует морфологическое заболевание, если в костном мозге содержится более или равно 5% бластов, например, как детектируют с применением световой микроскопии, например, более или равно 10% бластов в костном мозге, более или равно 20% бластов в костном мозге, более или равно 30% бластов в костном мозге, более или равно 40% бластов в костном мозге или более или равно 50% бластов в костном мозге. В определенных вариантах осуществления индивидуума демонстрирует полную или клиническую ремиссию, если в костном мозге содержится менее 5% бластов.

[0414] В определенных вариантах осуществления индивидуум может демонстрировать полную ремиссию, но у них присутствует небольшая доля морфологически недетектируемых (но детектируемых способами световой микроскопии) остаточных лейкозных клеток. Говорят, что индивидуум демонстрирует минимальное остаточное заболевание (MRD), если индивидуум демонстрирует менее 5% бластов в костном мозге и демонстрирует детектируемую молекулярными способами злокачественную опухоль. В определенных вариантах осуществления детектируемую молекулярными способами злокачественную опухоль можно оценивать с использованием любого из множества молекулярных способов, которые обеспечивают чувствительную детекцию небольшого количества клеток. В определенных аспектах такие способы включают анализы ПЦР, посредством которых можно определять уникальные перестройки генов Ig/рецепторов Т-клеток или слияние транскриптов, продуцируемых вследствие хромосомных транслокаций. В определенных вариантах осуществления для идентификации злокачественных клеток на основе лейкоз-специфичных иммунофенотипов можно использовать проточную цитометрию. В определенных вариантах осуществления посредством молекулярной детекции злокачественной опухоли можно детектировать вплоть до 1 лейкозной клетки в 100000 нормальных клетках. В определенных вариантах осуществления индивидуум демонстрирует MRD, которую детектируют молекулярными способами, если, например, посредством ПЦР или проточной цитометрии, детектируют по меньшей мере или более 1 лейкозной клетки в 100000 клетках. В определенных вариантах осуществления тяжесть заболевания индивидуума молекулярными способами недетектируема или оно является MRD⁺, так, что, в определенных случаях детектировать у индивидуума лейкозные клетки с использованием способов ПЦР или проточной цитометрии невозможно.

[0415] В некоторых аспектах заболевание или патологическое состояние после введения первой дозы сохраняется и/или введения первой дозы для устранения у индивидуума заболевания или патологического состояния недостаточно.

[0416] В определенных вариантах осуществления способ снижает тяжесть заболевания или патологического состояния, например, количество опухолевых клеток, размер опухоли, увеличивает продолжительность жизни пациента или бессобытийную продолжительность жизни, до лучшей степени и/или до лучшего периода времени по сравнению со снижением, которое можно наблюдать при применении сравнимого способа с использованием альтернативной схемы лечения, например, схемы, когда индивидуум получает одно или несколько альтернативных терапевтических средств, и/или схемы, когда индивидуум не получает дозы клеток и/или средства для лимфодеплеции с применением предоставляемых способов и/или с применением предоставляемых промышленных изделий или композиций. В определенных вариантах осуществления альтернативную дозу клеток обозначают как эталонная композиция. В определенных вариантах осуществления эталонная композиция содержит неопределенное количество клеток конкретного фенотипа и/или клеток конкретного фенотипа не в конкретном определенном отношении по вариантам осуществления, предоставляемым по настоящему документу. В определенных вариантах осуществления эталонная композиция представляет собой эталонную композицию, в которой содержатся большая частота или количество Т-клеток с эффекторным или дифференцированным фенотипом. В определенных вариантах осуществления детектируют, оценивают или определяют тяжесть заболевания или патологического состояния у индивидуума. Тяжесть заболевания можно детектировать в определенных аспектах посредством детекции общее количество обуславливающих заболевание или ассоциированных с заболеванием клеток, например, опухолевых клеток, у индивидуума или в органе, ткани или физиологической жидкости индивидуума, такой как кровь или сыворотка. В определенных аспектах оценивают продолжительность жизни индивидуума, продолжительность жизни в течение определенного периода времени, степень выживания, наличие или длительность бессобытийной или бессимптомной продолжительности жизни или продолжительности жизни без рецидивов. В определенных вариантах осуществления оценивают любой симптом заболевания или патологического состояния. В определенных вариантах осуществления мерой определяют тяжесть заболевания или патологического состояния.

[0417] В определенных вариантах осуществления предоставляемыми способами улучшают коэффициент бессобытийной выживаемости или общий коэффициент выживаемости у индивидуума, по сравнению с другими способами, например, способами, где индивидуум получает одно или несколько альтернативных терапевтических средств, и/или способами, где индивидуум не получает дозы клеток (например, получает эталонную композицию) и/или средства для лимфодеплеции, предоставляемыми способами и/или с использованием предоставляемых промышленных изделий или композиций. Например, в определенных вариантах осуществления коэффициент или вероятность бессобытийной выживаемости у индивидуумов, подвергаемых лечению предоставляемыми способами через 6 месяцев после дозирования составляет более чем приблизительно 40%, более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 60%,

более чем приблизительно 70%, более чем приблизительно 80%, более чем приблизительно 90% или более чем приблизительно 95%. В определенных аспектах общий коэффициент выживаемости составляет более чем приблизительно 40%, более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 60%, более чем приблизительно 70%, более чем приблизительно 80%, более чем приблизительно 90%, или более чем приблизительно 95%. В определенных вариантах осуществления индивидуум, подвергаемый лечению предоставляемыми способами, демонстрирует бессобытийную продолжительность жизни, продолжительность жизни без рецидивов или продолжительность жизни по меньшей мере до 6 месяцев или по меньшей мере до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет. В определенных вариантах осуществления увеличивается период до начала прогрессирования, например, период до начала прогрессирования составляет более чем точно или приблизительно 6 месяцев или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

[0418] В определенных вариантах осуществления по сравнению с другими способами, например, способами, где индивидуум получает одно или несколько альтернативных терапевтических средств, и/или способами, где индивидуум не получает дозы клеток (например, получает эталонную композицию) и/или средства для лимфодеплеции предоставляемыми способами и/или с использованием предоставляемых промышленных изделий или композиций после лечения предоставляемым способом вероятность рецидива снижается. Например, в определенных вариантах осуществления вероятность рецидива через 6 месяцев после первой дозы составляет менее чем приблизительно 80%, менее чем приблизительно 70%, менее чем приблизительно 60%, менее чем приблизительно 50%, менее чем приблизительно 40%, менее чем приблизительно 30%, менее чем приблизительно 20% или менее чем приблизительно 10%.

[0419] В определенных случаях для оценки доступности, например, биодоступности вводимых клеток, определяют фармакокинетику вводимых клеток, например, адоптивно переносимых клеток. Способы определения фармакокинетики адоптивно переносимых клеток могут включать забор периферической крови у индивидуумов, которым вводили подвергнутые инженерии клетки, и определение количества или отношения подвергнутых инженерии клеток в периферической крови. Подходы для отбора и/или выделения клеток могут включать использование специфичных к химерному антигенному рецептору (CAR) антител (например, Brentjens et al., *Sci. Transl. Med.* 2013 Mar; 5(177): 177ra38), белка L (Zheng et al., *J. Transl. Med.* 2012 Feb; 10:29), эпитопных меток, таких как последовательности Strep-Tag, вводимые непосредственно в конкретные участки в CAR, при этом для прямого доступа к CAR используют связывающие Strep-Tag реагенты (Liu et al. (2016) *Nature Biotechnology*, 34:430; публикация международной патентной заявки № WO2015095895), и моноклональные антитела, которые специфически связываются с полипептидом CAR (см. публикация международной патентной заявки № WO2014190273). В определенных случаях в связи с терапевтическими средствами с подвергнутыми инженерии клетками

для обеспечения детекции или отбора клеток и, в определенных случаях, также для стимуляции суицида клеток можно использовать внешние маркерные гены. В определенных случаях совместно с представляющим интерес трансгеном (CAR или TCR) в трансдуцированных клетках (см. например, патент США № 8802374) можно коэкспрессировать укороченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFRt). EGFRt может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимаб (эрбитукс®) или другим терапевтическим антителом к EGFR или связывающей его молекулой, которые можно использовать для идентификации или отбора клеток, которые были подвергнуты инженерии с использованием конструкции EGFRt и другим рекомбинантным рецептором, таким как химерный антигенный рецептор (CAR), и/или для устранения или отделения клеток, экспрессирующих рецептор. См. патент США № 8802374 и Liu et al., *Nature Biotech.* 2016 April; 34(4): 430-434).

[0420] В определенных вариантах осуществления можно определять количество CAR⁺ Т-клеток в биологическом образце, получаемом у пациента, например, крови, в период времени после введения клеточного терапевтического средства, например, для определения фармакокинетики клеток. В определенных вариантах осуществления количество CAR⁺ Т-клеток, необязательно CAR⁺ CD8⁺ Т-клеток и/или CAR⁺ CD4⁺ Т-клеток, детектируемых в крови индивидуума, или у большинства индивидуумов, обработанных предоставляемым способом, составляет более 1 клетки на мкл, более 5 клеток на мкл или более 10 клеток на мкл.

3. Оценка токсичности

[0421] В определенных аспектах способы включают определение ассоциации или зависимости между дозой клеток с клетками конкретного фенотипа, например, CCR7⁺-клетками, и токсикологическим исходом, например, развитием синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичности (NT), у индивидуумов, которым вводят такие дозы клеток.

[0422] В определенных аспектах токсикологический исход является синдромом высвобождения цитокинов (CRS) или тяжелым CRS (sCRS), или ассоциирован с ним, или является его показателем. CRS, например, sCRS, может наступать в определенных случаях после проведения адоптивной Т-клеточной терапии и введение индивидуумам других биологических продуктов. См. Davila et al., *Sci Transl Med* 6, 224ra25 (2014); Brentjens et al., *Sci. Transl. Med.* 5, 177ra38 (2013); Grupp et al., *N. Engl. J. Med.* 368, 1509-1518 (2013); и Kochenderfer et al., *Blood* 119, 2709-2720 (2012); Xu et al., *Cancer Letters* 343 (2014) 172-78.

[0423] Как правило, CRS вызван чрезмерным системным иммунным ответом, опосредуемым, 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 инициировать острый воспалительный ответ и/или индуцировать повреждение эндотелиального органа, что может приводить к увеличению проницаемости капилляров, сердечной недостаточности или гибели. Тяжелый, опасный для жизни CRS может приводить к инфильтрации легких и

повреждению легких, почечной недостаточности или диссеминированному внутрисосудистому свертыванию. Другие тяжелые, опасные для жизни виды токсичности могут включать кардиотоксичность, расстройства дыхания, нейротоксичность и/или печеночную недостаточность. В определенных аспектах с CRS ассоциирована лихорадка, особенно тяжелая лихорадка ($\geq 38,5^{\circ}\text{C}$ или $\geq 101,3^{\circ}\text{F}$). В определенных случаях характеристики или симптомы CRS имитируют инфекцию. В определенных вариантах осуществления инфекция у индивидуумов с симптомами CRS также предполагают, и можно проводить мониторинг посредством культивирования и эмпирическую антибиотикотерапию. Другие симптомы, ассоциированные с CRS могут включать дисфункцию сердца, респираторный дистресс-синдром взрослых, почечную и/или печеночную недостаточность, коагулопатии, диссеминированное внутрисосудистое свертывание и синдром повышенной проницаемости капилляров.

[0424] CRS можно лечить с использованием противовоспалительной терапии, такой как терапии против IL-6, например, антителом к IL-6, например, тоцилизумабом, или антибиотиками или другими средствами, как описано. Исходы, признаки и симптомы CRS известны и включают исходы, признаки и симптомы, описываемые в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления, где конкретная схема лечения или введения влияет или не влияет на данный ассоциированный с CRS исход, признак или симптом, можно определять конкретные исходы, признаки и симптомы и/или их количества или степени.

[0425] В отношении введения экспрессирующих CAR клеток, CRS, как правило, происходит через 6-20 суток после инфузии клеток, которые экспрессируют CAR. См. *Xu et al., Cancer Letters* 343 (2014) 172-78. В определенных случаях CRS происходит менее чем через 6 суток или более чем через 20 суток после инфузии CAR T-клеток. Частота и сроки CRS могут быть связаны с исходными уровнями цитокинов или опухолевой нагрузкой в момент инфузии. Как правило, CRS включает повышенные уровни интерферона (IFN)- γ , фактора некроза опухоли (TNF)- α и/или интерлейкина (IL)-2 в сыворотке. Другие цитокины, индукция которых может быстро происходить при CRS, представляют собой IL-1 β , IL-6, IL-8 и IL-10.

[0426] Иллюстративные исходы, ассоциированные с CRS включают лихорадку, ригидность, озноб, пониженное давление, одышку, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), энцефалопатию, повышение ALT/AST, почечную недостаточность, кардиопатии, гипоксию, неврологические расстройства и гибель. Неврологические осложнения включают делирий, подобную судорогам активность, спутанность сознания, затруднения с подбором слов, афазию и/или заторможенность. Другие связанные с CRS исходы включают усталость, тошноту, головную боль, судороги, тахикардию, миалгии, сыпь, острый синдром пропотевания жидкости из сосудов, нарушение функций печени и почечную недостаточность. В определенных аспектах CRS ассоциирован с возрастанием одного или нескольких факторов, таких как сывороточный ферритин, d-димер,

аминотрансферазы, лактатдегидрогеназа и триглицериды, или с гипофибриногенемией или гепатоспленомегалией.

[0427] В определенных вариантах осуществления исходы, ассоциированные с CRS включают один или несколько из: устойчивую лихорадку, например, лихорадку с определенной температурой, например, более чем точно или приблизительно 38 градусов Цельсия, в течение двух или более, например, трех или более, например, четыре или более суток или в течение по меньшей мере трех последовательных суток; лихорадку более чем точно или приблизительно 38 градусов Цельсия; повышение цитокинов, например, изменение максимального содержания, например, по меньшей мере или приблизительно в 75 раз по сравнению с уровнями до лечения по меньшей мере двух цитокинов (например, по меньшей мере двух из группы, состоящей из интерферона гамма ($IFN\gamma$), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5 и/или фактора некроза опухоли альфа ($TNF\alpha$)), или изменение максимального содержания, например, по меньшей мере или приблизительно в 250 раз по меньшей мере одного из таких цитокинов; и/или по меньшей мере один клинический признак токсичности, такой как пониженное давление (например, как измеряют посредством по меньшей мере одного внутривенного сосудосуживающего); гипоксия (например, уровни кислорода (PO_2) в плазме менее чем точно или приблизительно 90%) и/или одно или несколько неврологических нарушений (включая изменения психического состояния, притупление болевой чувствительности и судороги). В определенных вариантах осуществления нейротоксичность (NT) можно наблюдать одновременно с CRS.

[0428] Иллюстративные связанные с CRS исходы включают увеличенные или высокие сывороточные уровни одного или нескольких факторов, включающих цитокины и хемокины, и других факторов, ассоциированных с CRS. Иллюстративные исходы дополнительно включают возрастание синтеза или секреции одного или нескольких из таких факторов. Такой синтез или секреция могут обеспечивать Т-клетки или клетки, которые взаимодействуют с Т-клетками, такие как незрелые иммунные клетки или В-клетки.

[0429] В определенных вариантах осуществления ассоциированные с CRS сывороточные факторы или связанные с CRS исходы включают воспалительные цитокины и/или хемокины, включая интерферон гамма ($IFN-\gamma$), $TNF-\alpha$, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Ra, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), воспалительный белок макрофагов (MIP)-1, фактор некроза опухоли альфа ($TNF\alpha$), IL-6, и IL-10, IL-1 β , IL-8, IL-2, MIP-1, Flt-3L, фракталкин и/или IL-5. В определенных вариантах осуществления признак или исход включают С-реактивный белок (CRP). Кроме того, что CRP является ранним и легко измеряемым фактором риска CRS, CRP также является маркером экспансии клеток. В определенных вариантах осуществления у индивидуумов, у которых определяют наличие высоких уровней CRP, например, ≥ 15 мг/дл, выявляют CRS. В определенных вариантах осуществления у индивидуумов, у которых определяют наличие высоких уровней CRP,

CRS не выявляют. В определенных вариантах осуществления мера CRS включает определение CRP и другого фактора, указывающего на CRS.

[0430] В определенных вариантах осуществления перед лечением CAR, в течение или после него проводят мониторинг одного или нескольких воспалительных цитокинов или хемокинов. В определенных аспектах один или несколько цитокинов или хемокинов включают IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2R α , гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) или воспалительный белок макрофагов (MIP). В определенных вариантах осуществления проводят мониторинг IFN- γ , TNF- α и IL-6.

[0431] Для предсказания того, у каких из пациентов будет высокая вероятность риска развития sCRS, разработаны критерии CRS, которые, по-видимому, коррелируют с началом CRS. (см. Davilla et al. Science translational medicine. 2014;6(224):224ra25). Факторы включают лихорадку, гипоксию, пониженное давление, неврологические изменения, повышенные сывороточные уровни воспалительных цитокинов, таких как множество из семи цитокинов (IFN γ , IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и GM-CSF), чье индуцированное лечением повышение уровня может хорошо коррелировать с опухолевой нагрузкой перед лечением и симптомами sCRS. Известны другие руководства по диагностике и регуляции CRS (см. например, Lee et al, Blood. 2014;124(2):188-95). В определенных вариантах осуществления критерии, отражающие степень CRS, являются такими, как подробно описано в таблице 1 ниже.

Таблица 2: Иллюстративные критерии градации для CRS	
Степень	описание симптомов
1 мягкий	Не опасен для жизни, требует только симптоматического лечения, такого как жаропонижающие и противорвотные (например, лихорадка, тошнота, усталость, головная боль, миалгии, недомогание)
2 умеренный	Требует и реагирует на умеренную интервенцию: • Необходимость в кислороде < 40%, или • Пониженное давление, реагирующее на жидкости или низкие дозы одного сосудосуживающего средства, или • Степень 2 органотоксичности (по CTCAE v4.0)
3 тяжелый	Требует и реагирует на агрессивную интервенцию: • Необходимость в кислороде $\geq$ 40%, или • Пониженное давление, требующее высокой дозы одного сосудосуживающего средства (например, норадреналина $\geq$ 20 мкг/кг/мин, дофамина $\geq$ 10 мкг/кг/мин, фенилэфрина $\geq$ 200 мкг/кг/мин или эпинефрина $\geq$ 10 мкг/кг/мин), или

	- Пониженное давление, требующее нескольких сосудосуживающих средств (например, вазопрессина и одного из указанных выше средств, или комбинацию сосудосуживающих средств, эквивалентную ≥ 20 мкг/кг/мин норадреналина), или - Степень 3 органотоксичности или степень 4 трансамината (по STCAE v4.0)
4 опасный для жизни	Опасный для жизни: - Необходимость в ИВЛ, или - Степень 4 органотоксичности (исключая трансаминат)
5 летальный	Гибель

[0432] В определенных аспектах критерии, отражающие степень CRS, представляют собой критерии, подробно описанные в таблице 3 ниже.

Таблица 3. Иллюстративные критерии градации CRS				
Симптомы/Признаки	Степень 1 (мягкий)	Степень 2 (умеренный)	Степень 3 (тяжелый)	Степень 4 (опасный для жизни)
		Степень CRS определяется по наиболее тяжелому симптому (исключая лихорадку)		
Температура $\geq 38,5^\circ\text{C}/101,3^\circ\text{F}$	Любая	Любая	Любая	Любая
Систолическое артериальное давление ≤ 90 мм Нг	н./п.	Реагирует на жидкость или низкую дозу одного сосудосуживающего	Необходима высокая доза или несколько сосудосуживающих	Опасный для жизни
Необходимость в кислороде для достижения $\text{SaO}_2 > 90\%$	н./п.	$\text{FiO}_2 < 40\%$	$\text{FiO}_2 \geq 40\%$	Необходима ИВЛ
Органотоксичность	н./п.	Степень 2	Степень 3 или трансаминат	Степень 4 (исключая трансаминат)

				)
--	--	--	--	---

[0433] В определенных вариантах осуществления полагают, что у индивидуума развивается "тяжелый CRS" ("sCRS") в ответ на клеточное терапевтическое средство или дозу его клеток или после их введения, если после введения, у индивидуума выявляют: (1) лихорадку с температурой по меньшей мере 38 градусов Цельсия в течение по меньшей мере трех суток; (2) повышение уровня цитокинов, которое включает (а) изменение максимального содержания по меньшей мере в 75 раз в течение по меньшей мере двух из следующей группы из семи цитокинов по сравнению с уровнем сразу после введения: интерферон гамма (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и IL-5 и/или (b) изменение максимального содержания по меньшей мере в 250 раз в течение по меньшей мере одного из следующей группы из семи цитокинов по сравнению с уровнем сразу после введения: интерферон гамма (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и IL-5; и (с) по меньшей мере один клинический признак токсичности, такой как пониженное давление (требующее по меньшей мере одного внутривенного сосудосуживающего) или гипоксия (PO₂<90%) или одного или нескольких неврологических нарушений (включая изменения психического состояния, притупление болевой чувствительности и/или судороги). В определенных вариантах осуществления тяжелый CRS включает CRS со степенью 3 или более, например, как указано в таблице 2 или таблице 3.

[0434] В определенных вариантах осуществления исходы, ассоциированные с тяжелым CRS или степенью 3 CRS или более, такой как степень 4 или более, включают один или несколько из: устойчивой лихорадки, например, лихорадка с определенной температурой, например, более чем точно или приблизительно 38 градусов Цельсия, в течение двух или более, например, трех или более, например, четырех или более суток, или в течение по меньшей мере трех последовательных суток; лихорадки более чем точно или приблизительно 38 градусов Цельсия; подъема уровней цитокинов, например, изменение максимального содержания, например, по меньшей мере или приблизительно в 75 раз по сравнению с уровнями до лечения, по меньшей мере двух цитокинов (например, по меньшей мере двух из группы, состоящей из интерферона гамма (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5 и/или фактор некроза опухоли альфа (TNF α)), или изменение максимального содержания, например, по меньшей мере или приблизительно в 250 раз по меньшей мере одного из таких цитокинов; и/или по меньшей мере одного клинического признака токсичности, такого как пониженное давление (например, как измеряют посредством по меньшей мере одного внутривенного сосудосуживающего); гипоксия (например, уровни кислорода в плазме (PO₂) менее чем точно или приблизительно 90%); и/или одно или несколько неврологических нарушений (включая изменения психического состояния, притупление болевой чувствительности и судороги). В определенных вариантах осуществления тяжелый CRS включает CRS, который требует регуляции или ухода в отделении интенсивной терапии (ICU).

[0435] В определенных вариантах осуществления CRS, такой как тяжелый CRS, включает комбинацию (1) устойчивой лихорадки (лихорадка по меньшей мере 38

градусов Цельсия в течение по меньшей мере трех суток) и (2) уровень CRP в сыворотке по меньшей мере или приблизительно 20 мг/дл. В определенных вариантах осуществления CRS включает пониженное давление, требующее применение двух или более сосудосуживающих, или дыхательную недостаточность, требующую искусственной вентиляции. В определенных вариантах осуществления дозировку сосудосуживающих при втором или последующих введениях увеличивают.

[0436] В определенных вариантах осуществления тяжелый CRS или степень 3 CRS включает увеличение уровня аланинаминотрансферазы, увеличение уровня аспаратаминотрансферазы, озноб, фебрильную нейтропению, головную боль, дисфункцию левого желудочка, энцефалопатию, гидроцефалию и/или тремор.

[0437] Можно определить способ измерения или детекции различных исходов.

[0438] В определенных аспектах токсикологический исход представляет собой нейротоксичность или ассоциирован с ней. В определенных вариантах осуществления симптомы, ассоциированные с клиническим риском нейротоксичности включают спутанность сознания, делирий, экспрессивную афазию, притупление болевой чувствительности, миоклонические судороги, сонливость, измененное психическое состояние, судороги, подобную судорогам активность, судорожные припадки (необязательно подтвержденные электроэнцефалограммой [EEG]), повышенными уровнями бета-амилоида (A β), повышенными уровнями глутамината и повышенными уровнями кислородных радикалов. В определенных вариантах осуществления нейротоксичность классифицируют на основе тяжести (например, с использованием шкалы 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)).

[0439] В определенных случаях неврологические симптомы могут быть наиболее ранними симптомами sCRS. В некоторых вариантах осуществления неврологические симптомы начинаются через 5-7 дней после инфузии клеточного терапевтического средства. В определенных вариантах осуществления длительность неврологических изменений может находиться в диапазоне от 3 до 19 суток. В определенных случаях восстановление после неврологических изменений происходит после разрешения других симптомов sCRS. В определенных вариантах осуществления время или степень разрешения неврологических изменений не ускоряется при лечении средствами против IL-6 и/или стероидом(ами).

[0440] В определенных вариантах осуществления полагают, что у индивидуума развивается "тяжелая нейротоксичность" в ответ на введение клеточного терапевтического средства или дозы его клеток или после него, если после введения у индивидуума выявляют симптомы, которые ограничивают самообслуживание (например, мытье, одевание и раздевание, питание, пользование туалетом, прием лекарственных средств) из числа: 1) симптомов периферической двигательной невропатии, включая воспаление или дегенерацию периферических двигательных нервов; 2) симптомов

периферической сенсорной невропатии, включая воспаление или дегенерацию периферических чувствительных нервов, дизестезию, такую как искажение сенсорного восприятия, приводящие к аномальным и неприятным ощущениям, невралгию, такую как интенсивные болезненные ощущения вдоль нерва или группы нервов, и/или парестезию, такую как функциональные нарушения сенсорных нейронов, приводящие к аномальному кожному ощущению покалывания, оцепенения, давления, холода и тепла в отсутствие стимула. В определенных вариантах осуществления тяжелая нейротоксичность включает нейротоксичность со степенью 3 или более, такую как указано в таблице 4.

Таблица 4: Иллюстративные критерии градации нейротоксичности	
Степень	Описание симптомов
1 бессимптомная или слабая	Слабые или отсутствующие симптомы
2 умеренная	Наличие симптомов, которые ограничивают инструментальную повседневную активность (ADL), такую как приготовление пищи, посещение магазинов, пользование телефоном, распоряжение деньгами
3 тяжелая	Наличие симптомов, которые ограничивают самообслуживание при ADL, такое как мытье, одевание и раздевание, самостоятельное принятие пищи, пользование туалетом, прием медикаментов
4 Опасная для жизни	Симптомы, опасные для жизни, требующие срочного вмешательства
5 летальная	Гибель

[0441] В определенных вариантах осуществления способы снижают симптомы, ассоциированные с CRS или нейротоксичностью по сравнению с другими способами. В определенных аспектах предоставляемые способы снижают симптомы, исходы или факторы, ассоциированные с CRS, включая симптомы, исходы или факторы, ассоциированные с тяжелым CRS или CRS степени 3 или более, по сравнению с другими способами. Например, у индивидуумов, подвергаемых лечению способами по настоящему изобретению, могут не детектироваться и/или быть сниженными симптомы, исходы или факторы CRS, например, тяжелого CRS или CRS степени 3 или более, такие как любой из описанных, например, как указано в таблице 1 или таблице 2. В определенных вариантах осуществления у индивидуумов, подвергаемых лечению способами по настоящему изобретению, могут быть снижены симптомы нейротоксичности, такие как слабость в

конечностях или оцепенение, потеря памяти, зрения и/или интеллекта, неконтролируемое навязчивое и/или компульсивное поведение, иллюзии, головная боль, когнитивные и поведенческие нарушения, включая потерю двигательного контроля, когнитивные нарушения и дисфункцию автономной нервной системы и сексуальную дисфункцию, по сравнению с индивидуумами, подвергаемыми лечению другими способами. В определенных вариантах осуществления у индивидуумов, подвергаемых лечению способами по настоящему изобретению, могут наблюдать сниженные симптомы, ассоциированные с периферической двигательной невропатией, периферической сенсорной невропатией, дизестезией, невралгией или парестезией.

[0442] В определенных вариантах осуществления способы снижают исходы, ассоциированные с нейротоксичностью, включая повреждения нервной системы и/или головного мозга, такие как гибель нейронов. В определенных аспектах способы снижают уровень факторов, ассоциированных с нейротоксичностью, таких как бета-амилоид (A β), глутаминат и кислородные радикалы.

[0443] В определенных вариантах осуществления токсикологический исход представляет собой лимитирующую дозу токсичности (DLT). В определенных вариантах осуществления токсический исход представляет собой лимитирующую дозу токсичности. В определенных вариантах осуществления токсикологический исход представляет собой отсутствие лимитирующей дозу токсичности. В определенных вариантах осуществления лимитирующая дозу токсичности (DLT) определена как любая степень токсичности 3 или более, как оценивают по любому из известных или опубликованных руководств для оценки конкретной токсичности, такое как любое из описанных выше и включающее National Cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) версии 4.0.

[0444] В определенных вариантах осуществления низкая степень, риск или вероятность развития токсичности, например, CRS или нейротоксичности или тяжелого CRS или нейротоксичности, например, CRS или нейротоксичности степени 3 или более, наблюдаемые при введении дозы Т-клеток предоставляемыми способами и/или с использованием предоставляемых промышленных изделий или композиций, позволяют введение клеточного терапевтического средства в амбулаторных условиях. В определенных вариантах осуществления введение клеточного терапевтического средства, например, дозы Т-клеток (например, CAR⁺ Т-клеток) предоставляемыми способами и/или с использованием предоставляемых промышленных изделий или композиций, проводят в амбулаторных условиях или они не требуют госпитализации индивидуума, например, госпитализации, требующий проведения ночи в стационаре.

[0445] В определенных аспектах индивидуумам, которым вводят клеточное терапевтическое средство, например, дозу Т-клеток (например, CAR⁺ Т-клеток) предоставляемыми способами и/или с использованием предоставляемых промышленных изделий или композиций, включая индивидуумов, проходящих лечение в амбулаторных условиях, не проводят вмешательства для лечения какой-либо токсичности до введения

дозы клеток или вместе с ней, до выявления у индивидуума признаков или симптомов токсичности, такой как нейротоксичность или CRS. Иллюстративные средства для лечения, задержки, ослабления или снижения тяжести токсичности описаны в настоящем документе.

[0446] В определенных вариантах осуществления, если индивидуум, которому вводят клеточное терапевтическое средство, например, дозу Т-клеток (например, CAR⁺ Т-клеток), включая индивидуумов, проходящих лечение в амбулаторных условиях, демонстрирует лихорадку, индивидууму вводят или дают инструкции для получения или введения лекарственного средства для снижения лихорадки. В определенных вариантах осуществления лихорадка у индивидуума характеризуется как температура тела индивидуума, которая находится (или ее измеряют) на определенных пороговых значениях температуры или уровне или превышает их. В определенных аспектах пороговое значение температуры представляет собой значение, ассоциированное по меньшей мере с низкой степенью лихорадки, по меньшей мере с умеренной лихорадкой и/или по меньшей мере с высокой степенью лихорадки. В определенных вариантах осуществления пороговое значение температуры представляет собой конкретную температуру или диапазон температур. Например, пороговое значение температуры может составлять точно или приблизительно или по меньшей мере или приблизительно 38, 39, 40, 41 или 42 градусов Цельсия и/или может находиться в диапазоне от точно или приблизительно 38 градусов Цельсия до точно или приблизительно 39 градусов Цельсия, в диапазоне от точно или приблизительно 39 градусов Цельсия до точно или приблизительно 40 градусов Цельсия, в диапазоне от точно или приблизительно 40 градусов Цельсия до точно или приблизительно 41 градуса или в диапазоне от точно или приблизительно 41 градуса Цельсия до точно или приблизительно 42 градусов Цельсия.

[0447] В определенных вариантах осуществления лечение, предназначенное для снижения лихорадки, включает лечение жаропонижающим. Жаропонижающее может включать любое средство, например, соединение, композицию или ингредиент, которое снижает лихорадку, такое как одно из любого количества средств, известных как обладающих жаропонижающим действием, например, NSAID (такое как ибупрофен, напроксен, кетопрофен и нимесулид), салицилаты, такие как аспирин, салицилат холина, салицилат магния и салицилат натрия, парацетамол, ацетаминофен, метамизол, набуметон, фенаксон, антипирин, антипиретики. В определенных вариантах осуществления жаропонижающее представляет собой ацетаминофен. В определенных вариантах осуществления ацетаминофен можно вводить в дозе 12,5 мг/кг перорально или внутривенно каждые четыре часа. В определенных вариантах осуществления оно представляет собой или содержит ибупрофен или аспирин.

[0448] В определенных вариантах осуществления, если лихорадка является устойчивой лихорадкой, индивидууму вводят альтернативный препарат для лечения токсичности, такой как любой, из описанных в разделе II ниже. Для индивидуумов, проходящих лечение в амбулаторных условиях, индивидууму дают инструкции для

возвращения в стационар, если у индивидуума присутствует устойчивая лихорадка и/или определяют ее наличие. В определенных вариантах осуществления у индивидуума присутствует устойчивая лихорадка и/или определяют или полагают ее присутствие, если он или она демонстрируют лихорадку на уровне соответствующего порогового значения температуры или выше, и когда лихорадка или температура тела индивидуума не снижаются, или не уменьшаются на или более чем на указанное количество (например, более чем на 1°C, и, как правило, не меняется приблизительно или более чем приблизительно на 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C) после специализированного лечения, такого как лечение, предназначенное для снижения лихорадки, такое как лечение жаропонижающим, например, NSAID или салицилатами, например, ибупрофеном, ацетаминофеном или аспирином. Например, полагают, что у индивидуума присутствует устойчивая лихорадка, если он или она демонстрируют или у них определяют наличие лихорадки по меньшей мере или приблизительно 38 или 39 градусов Цельсия, которая не снижается или не снижается более чем точно или приблизительно на 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C, или точно или приблизительно на 1%, 2%, 3%, 4% или 5% в течение периода 6 часов, в течение периода 8 часов, или в течение периода 12 часов, или в течение периода 24 часов, даже после лечения жаропонижающим, таким как ацетаминофен. В определенных вариантах осуществления дозировка жаропонижающего представляет собой дозировку, как правило, эффективную у такого индивидуума для снижения лихорадки или лихорадки конкретного типа, такой как лихорадка, ассоциированная с бактериальной или вирусной инфекцией, например, локализованной или системной инфекцией.

[0449] В определенных вариантах осуществления у индивидуума присутствует устойчивая лихорадка и/или определяют или полагают ее наличие, если он или она демонстрируют лихорадка на уровне соответствующего порогов значения температуры или выше, и где лихорадка или температура тела индивидуума не варьирует приблизительно или более чем приблизительно на 1°C, и как правило не варьирует приблизительно или более чем приблизительно на 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C. Такое отсутствие указанных выше колебаний или определенное значение, как правило, измеряют в течение определенного периода времени (такого как период времени в течение 24 часов, 12 часов, 8 часов, 6 часов, 3 часов или 1 часа, где можно проводить измерения от первого признака лихорадки или первой температуры выше указанного порогового значения). Например, в определенных вариантах осуществления у индивидуума полагают наличие или определяют наличие устойчивой лихорадки, если он или она демонстрируют лихорадка по меньшей мере или приблизительно или по меньшей мере или приблизительно 38 или 39 градусов Цельсия, при которой температура не изменяется более чем точно или приблизительно на 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C в течение периода 6 часов, в течение периода 8 часов, или в течение периода 12 часов, или в течение периода 24 часов.

[0450] В определенных вариантах осуществления лихорадка представляет собой устойчивую лихорадку; в определенных аспектах индивидуума подвергают лечению в течение периода времени, когда у индивидуума определяют наличие устойчивой лихорадки, например, в течение одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или менее часов такого определения или первого такого определения после начала лечения с потенциалом индукции токсичности, такого как клеточное терапевтическое средство, такое как доза Т-клеток, например, CAR⁺ Т-клеток.

[0451] В определенных вариантах осуществления проводят одно или несколько вмешательств или вводят средства для лечения токсичность, такие как воздействующие на токсичность терапевтические средства, в течение периода времени, когда или непосредственно после того, как у индивидуума определяют или подтверждают (например, впервые определяют или подтверждают) наличие устойчивой лихорадки, например, как измеряют по любому из указанных выше вариантов осуществления. В определенных вариантах осуществления одно или несколько воздействующих на токсичность терапевтических средства вводят в течение определенного периода времени после таких ее подтверждения или определения, например, в пределах 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 6 часов или 8 часов.

II. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ С ПОДВЕРГНУТЫМИ ИНЖЕНЕРИИ КЛЕТКАМИ

[0452] В предоставляемые варианты осуществления входят способы получения или производства композиции клеток, которая содержит подвергнутые генетической инженерии клетки. В определенных вариантах осуществления указанными способами получают выходящую композицию клеток, содержащую клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, такой как CAR, которая в определенных случаях представляет собой композицию терапевтических Т-клеток, например, для применения способами лечения индивидуума с заболеванием или патологическими состояниями. В определенных вариантах осуществления характеристики одного или нескольких этапов способа получения композиции с подвергнутыми инженерии клетками могут приводить к получению выходящих композиций, обогащенных клетками с определенными характеристиками или фенотипы, как описано, например, обогащенных по сравнению с характеристикой фенотипа в клетках исходного материала, используемых для получения композиций с подвергнутыми инженерии клетками. В определенных вариантах осуществления композиции подвергнутых инженерии или терапевтических Т-клеток, такие как выходящие композиции, получаемые или производимые способом, предоставленным в настоящем документе, демонстрируют фенотип и функциональные признаки, ассоциированные с менее дифференцированным Т-клеточным продуктом или продуктом, обогащенным подмножествами подобных наивным Т-клеток или центральных Т-клеток памяти, и/или более функционально активным Т-клеточным продуктом, который в определенных случаях коррелирует с улучшенными фармакокинетическими свойствами или ответами, такими как длительность ответа и/или продолжительность

жизни без прогрессирования при введении индивидуумам. Также предоставлены композиции терапевтических Т-клеток, например, выходящие композиции, содержащие Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, в которых клетки композиции обогащены или демонстрируют определенное процентное содержание клеток с одним или несколькими фенотипическими или функциональными признаками, как описано, включая признаки, ассоциированные с менее дифференцированным Т-клеточным продуктом или продуктом, обогащенным подмножествами подобных наивным Т-клеток или центральных Т-клеток памяти, и/или более функционально активным Т-клеточным продуктом.

[0453] В определенных вариантах осуществления способы включают получение или производство композиции клеток (например, композиции терапевтических Т-клеток) способом, который включает одну или несколько обработок или дополнительные этапы обработки, такие как этапы криоконсервации, выделения, разделения, отбора, активации или стимуляции, трансдукции, культивирования, роста, отмывки, суспендирования, разведения, концентрации и/или формулирования клеток. В определенных вариантах осуществления способы получения или производства композиции клеток (например, композиции терапевтических Т-клеток) включают выделение клеток у индивидуума, получение, обработку, культивирования в одних или нескольких стимулирующих условиях. В определенных вариантах осуществления способ включает этапы обработки, проводимые в порядке, при котором: клетки, например, первичные клетки (например, Т-клетки), сначала выделяют, например, посредством отбора или разделения, из биологического образца (например, образца крови, образца афереза, образца лейкофереза); отобранные клетки инкубируют с частицами вирусного вектора для трансдукции, необязательно с последующим этапом стимуляции выделенных клеток в присутствии стимулирующего реагента; культивирование трансдуцированных клеток, например, для наращивания клеток; формулирование трансдуцированных клеток в композиции и помещение композиции в предоставляемый контейнер. В определенных вариантах осуществления композицию клеток вводят пациенту, например, в виде стандартной дозы. В определенных вариантах осуществления композиция клеток, содержащая получаемые подвергнутые инженерии клетки повторно вносят тому же индивидууму, до или после криоконсервации. В определенных вариантах осуществления клетки на одном или нескольких этапах из этапов, включающих моменты времени до и/или после выделения, отбор, трансдукцию и/или культивирование, клетки можно подвергать криоконсервации, а затем размораживать.

[0454] В определенных вариантах осуществления один или несколько этапов обработки могут включать одно или несколько из (а) отмывки биологического образца, содержащего клетки (например, образца цельной крови, образца лейкоцитарного слоя, образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), образца нефракционированных Т-клеток, образца лимфоцитов, образца лейкоцитов, продукта афереза или продукта лейкофереза), (b) выделения, например, выделения из образца требуемого подмножества или популяции клеток (например, CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток),

например, посредством инкубации клеток с реагентом для отбора или иммуноаффинным реагентом для основанного на иммуноаффинности разделения; с) инкубации выделенных клеток, таких как отобранные клетки, с частицами вирусного вектора, (d) культивирования или наращивания клеток такими способами, как описано, и (e) формулирование трансдуцированных клеток, например, в фармацевтически приемлемом буфере, криоконсерванте или другой подходящей среде. В определенных вариантах осуществления способы могут дополнительно включать (e) стимуляцию клеток, посредством помещения клеток в стимулирующие условия, что можно проводить до, в течение и/или после инкубации клеток с частицами вирусного вектора. В определенных вариантах осуществления до или после любого из описанных выше этапов также можно проводить один или несколько дополнительных этапов отмывки или этап суспендирования, например, для разведения, концентрации и/или замены буфера клеток. В определенных аспектах получаемую композицию с подвергнутыми инженерии клетками (например, композицию терапевтических Т-клеток) помещают в один или несколько контейнеров. В определенных вариантах осуществления композицию клеток вводят пациенту, например, в виде стандартной дозы.

[0455] В определенных аспектах способы можно использовать для получения композиции клеток с конкретными свойствами, особенностями и/или характеристиками клеток в композиции для введения, такими как фенотипы клеток, например, присутствие и/или экспрессия поверхностного маркера и/или отсутствие или дефицит экспрессии поверхностного маркера. В определенных аспектах конкретные свойства, особенности и/или характеристики, например, фенотипы клеток, ассоциированы с требуемым исходом при терапии, например, требуемым ответом или безопасным исходом и/или демонстрацией требуемых фармакокинетических параметров, ассоциированных с такими требуемыми исходами. В определенных вариантах осуществления способы также включают определение и/или получение стандартной дозы, такой как стандартная доза композиции клеток, получаемой способами, описываемыми в настоящем документе, например, для введения индивидууму. В определенных аспектах композиции клеток и/или их стандартные дозы, получаемые способами, описываемыми в настоящем документе, можно использовать в терапевтических применениях, например, для введения индивидууму для клеточной терапии, например, включая любые способы лечения, описываемые в настоящем документе. В определенных аспектах композиции и/или стандартная доза клеток, описываемые в настоящем документе, могут обеспечивать или могут быть ассоциированы с конкретными требуемыми исходами терапии, например, требуемым ответом или безопасным исходом и/или демонстрировать требуемые фармакокинетические параметры, ассоциированные с такими требуемыми исходами. В определенных вариантах осуществления способы получения композиции клеток включают получение или производство входящей композиции для применения в этапах, описываемых в настоящем документе, для получения или производства композиции клеток. В определенных аспектах способы включают получение или производство

входящей композиции. В определенных вариантах осуществления один или несколько методов получения входящей композиции представляют собой или содержат этапы обработки, которые могут включать одно или несколько из (а) отмывки биологического образца, содержащего клетки (например, образца цельной крови, образца лейкоцитарного слоя, образца мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), образца нефракционированных Т-клеток, образца лимфоцитов, образца лейкоцитов, продукта афереза или продукта лейкоафереза), (b) выделения, например, отбора, из образца требуемого подмножества или популяции клеток (например, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток), например, посредством инкубации клеток с реагентом для отбора или иммуноаффинным реагентом для основанного на иммуноаффинности разделения. В определенных вариантах осуществления входящую композицию получают способом, который включает один или несколько этапов обработки, таких как этапы выделения, разделения, отбора. Таким образом, в определенных вариантах осуществления входящую композицию получают на первых этапах общего способа получения или производства композиции клеток. В определенных аспектах клетки для проведения инженерии предоставляемыми способами, такие как клетки во входящей композиции, представляют собой любые клетки, описываемые в настоящем документе, например, в разделе II.A. В определенных аспектах входящую композицию получают на основе требуемого количества или процентного содержания $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, получаемых у индивидуума для терапии, которые экспрессируют, например, экспрессируют на поверхности клетки, или не экспрессируют, один или несколько маркеров, ассоциированных с определенными фенотипами клеток, включая маркеры, ассоциированные или указывающие на менее дифференцированный фенотип клеток и/или маркеры, ассоциированные или указывающие на подтип клеток памяти. В определенных аспектах входящая композиция содержит требуемый процент Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA и/или требуемый процент $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA. В определенных вариантах осуществления входящая композиция содержит требуемое количество или процент (например, по меньшей мере или приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) Т-клеток (например, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток), которые не экспрессируют маркеры апоптоза (например, активированную каспазу-3, аннексин V).

[0456] В определенных аспектах входящая композиция является объектом генетической инженерии, например, посредством введения одного или нескольких средств содержащих полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор (например, химерный антигенный рецептор; CAR) или его часть и/или другие молекулы, такие как любые полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты, или одно или несколько средств, содержащих полинуклеотид, описываемый в настоящем документе, например, в разделе II.C.3. В определенных аспектах клетки во входящей композиции подвергают инженерии посредством введения одного или нескольких средств и/или полинуклеотида, таких как описаны в настоящем документе, например, в разделе II. C.3. В определенных вариантах

осуществления входящую композицию стимулируют до, в течение и/или после указанного внесения посредством инкубации клеток в присутствии одного или нескольких стимулирующих средств, где указанная стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток. В определенных вариантах осуществления стимуляцию можно проводить любыми способами стимуляции, описываемыми в настоящем документе, например, в разделе II.B. В определенных вариантах осуществления входящую композицию используют на любых этапах обработки или дополнительной обработки для получения или производства композиции клеток.

[0457] В определенных аспектах предоставляемыми способами получают выходящую композицию, содержащую подвергнутые генетической инженерии клетки, например, подвергнутые инженерии Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, например, химерный антигенный рецептор (CAR). В определенных аспектах выходящая композиция содержит определенное отношение, частоту и/или количество подвергнутых инженерии клеток, которые экспрессируют, например, экспрессируют на поверхности клетки, или не экспрессируют, один или несколько маркеров, ассоциированных с определенными фенотипами клеток, включая маркеры, ассоциированные или указывающие на менее дифференцированный фенотип клеток, и/или маркеры, ассоциированные или указывающие на подтип клеток памяти. В определенных аспектах выходящая композиция содержит определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит Т-клетки, которые не экспрессируют маркеры апоптоза (например, каспазу-3, аннексин V). В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит требуемое количество или процент (например, по меньшей мере или приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) Т-клеток, которые не экспрессируют маркеры апоптоза (например, каспазу-3, аннексин V). В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит требуемое количество или процент Т-клеток, которые после стимуляции продуцируют цитокины. В определенных вариантах осуществления стимуляция представляет собой специфичный к антигену рекомбинантный рецептор (например, CAR). В определенных вариантах осуществления стимуляция не является специфичным к антигену рекомбинантным рецептором (например, CAR), например, стимуляция включающая РМА/иономицин. В определенных вариантах осуществления продуцируемые цитокины представляют собой или содержат IL-2, TNF α и/или IFN γ . В определенных вариантах осуществления продуцируемые цитокины представляют собой или содержат IL-2 и/или TNF α . В

определенных аспектах требуемую выходящую композиция, например, содержащая определенное отношение клеток на основе определенных характеристик и/или фенотипы, можно получать способами, описываемыми в настоящем документе.

[0458] В определенных вариантах осуществления способы перед получением входящей композиция также включают предоставление или выделение, определение количества, количества на единицу объема, количества на единицу массы и/или процентного содержания CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA. В определенных вариантах осуществления способ включает определение количества, количества на единицу объема, количества на единицу массы и/или процентного содержания Т-клеток (например, CD4⁺, CD8⁺ Т-клетки), которые не экспрессируют маркеры апоптоза (например, каспазу-3, аннексин V).

[0459] В конкретных вариантах осуществления генетическая инженерия представляет собой или включает трансфекцию или трансдукцию клеток входящей композиции с введением средства, содержащего нуклеиновую кислоту, например, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, например, химерный антигенный рецептор (CAR). В определенных вариантах осуществления получение выходящей композиции клеток включает один или несколько этапов активации или стимуляции клеток входящей композиции; генетическую инженерию, трансдукцию или трансфекцию клеток входящей композиции; и/или наращивание трансфицированных клеток; таким образом, получая выходящую композицию клеток с определенным отношением экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции. В определенных вариантах осуществления один или несколько этапов приводят к выходящей композиции клеток, содержащей требуемое количество или процент Т-клеток, которые продуцируют цитокины после стимуляции. В определенных вариантах осуществления продуцируемые цитокины представляют собой или содержат IL-2, TNF α и/или IFN γ . В определенных вариантах осуществления продуцируемые цитокины представляют собой или содержат IL-2 и/или TNF α .

[0460] В определенных вариантах осуществления предоставляемые способы проводят так, что один, несколько или все этапы получения клеток для клинического применения, например, в адоптивной клеточной терапии, проводят без нахождения клеток в нестерильных условиях и без необходимости использования стерильных помещения или камеры. В определенных вариантах осуществления такого процесса клетки выделяют, разделяют или отбирают, трансдуцируют, отмывают, необязательно активируют или

стимулируют и формулируют в пределах закрытой системы. В определенных аспектах такого процесса клетки экспрессируют из закрытой системы и вносят в один или несколько емкостей с биоматериалами. В определенных вариантах осуществления способы проводят автоматизировано. В определенных вариантах осуществления один или несколько этапов проводят вне закрытой системы или устройства.

[0461] В определенных вариантах осуществления закрытую систему используют для проведения одного или нескольких других этапов обработки способа получения или производства клеточного терапевтического средства. В определенных вариантах осуществления один или несколько или все этапы обработки, например, выделение, отбор и/или обогащение, процессинг, инкубацию в связи с трансдукцией и инженерией, и этапы формулирования проводят с использованием системы, устройства или аппаратуры в интегрированной или замкнутой системы и/или в автоматизированном или программируемом режиме. В определенных аспектах система или устройство включает компьютер и/или компьютерную программу, связанную с системой или устройством, которые позволяют пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или настраивать различные аспекты этапов обработки, выделения, инженерии и формулирования. В одном из примеров система представляет собой систему, как описано в публикации международной патентной заявки № WO2009/072003 или US 20110003380 A1. В одном из примеров система представляет собой систему как описано в международной публикации № WO2016/073602.

А. Выделение или отбор клеток из образцов

[0462] В определенных вариантах осуществления этапы обработки включают выделение клеток или их композиций из биологических образцов, таких как образцы, получаемые у индивидуума, например, индивидуума с конкретным заболеванием или патологическим состоянием или с необходимостью клеточной терапии, или кому вводят клеточное терапевтическое средство. В определенных аспектах индивидуум является человеком, например, индивидуум, который является пациентом с необходимостью конкретной терапевтической интервенции, такой как адоптивная клеточная терапия для которой клетки выделяют, обрабатывают и/или подвергают инженерии. Таким образом, клетки в определенных вариантах осуществления представляют собой первичные клетки, например, первичные клетки человека. В определенных вариантах осуществления клетки содержат CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления клетки содержат CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки. Образцы включают ткань, жидкость и другие образцы, непосредственно получаемые у индивидуума. Образцы включают ткань, жидкость и другие образцы, непосредственно получаемые у индивидуума, а также образцы, являющиеся результатом одного или нескольких этапов обработки, таких как разделение, центрифугирование, генетическая инженерия (например, трансдукция вирусным вектором), отмывка и/или инкубация. Биологический образец может представлять собой образец, который получают непосредственно из биологического источника или образца, который подвергают обработке. Биологические образцы в качестве неограничивающих

примеров включают биологические жидкости организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, цереброспинальная жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая обработанные образцы, получаемые из них.

[0463] В определенных аспектах образец, из которого получают или выделяют клетки, представляет собой кровь или получаемый из крови образец, или представляет собой или его получают из продукта афереза или лейкоафереза, также обозначаемого в настоящем документе как образец афереза или лейкоафереза. Иллюстративные образцы включают цельную кровь, моноклеарные клетки периферической крови (РВМС), лейкоциты, костный мозг, тимус, тканевую биопсию, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфоузел, ассоциированную с кишечником лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистой лимфоидную ткань, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почку, поджелудочную железу, молочную железу, кость, предстательную железу, шейку матки, семенники, яичники, миндалину или другой орган, и/или клетки, получаемые из них. Образцы в контексте клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии, включают образцы из аутологичных и аллогенных источников.

[0464] В определенных вариантах осуществления клетки получают из линий клеток, например, линий Т-клеток. В определенных вариантах осуществления клетки получают из ксеногенного источника, например, у мыши, крысы, не являющегося человеком примата и свиньи.

[0465] В определенных примерах клетки получают из циркулирующей крови индивидуума, например, посредством афереза или лейкоафереза. В определенных аспектах образцы содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и/или тромбоциты, а в определенных аспектах образцы содержат клетки, отличные от эритроцитов и тромбоцитов.

[0466] В определенных вариантах осуществления клетки крови, получаемые у индивидуума отмывают, например, с удалением фракций плазмы и с помещением клеток в соответствующий буфер или среду для последующих этапов обработки. В определенных вариантах осуществления клетки отмывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В определенных вариантах осуществления в отмывочном растворе отсутствуют кальций и/или магний и/или многие или все двухвалентные катионы. В определенных аспектах этап отмывки проводят в полуавтоматизированной "проточной" центрифуге (например, the Cobe 2991 cell processor, Baxter) по инструкциям производителя. В определенных аспектах этап отмывки проводят посредством фильтрования тангенциальным потоком (TFF) по инструкциям производителя. В определенных вариантах осуществления клетки после отмывки ресуспендируют в ряде биосовместимых буферов, таких как, например, не содержащем $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ PBS. В определенных вариантах осуществления компоненты образца клеток крови удаляют и клетки непосредственно ресуспендируют в средах для культивирования.

[0467] Как правило, клетки являются эукариотическими клетками, такими как клетки млекопитающих, и, как правило, представляют собой клетки человека. В определенных вариантах осуществления клетки получают из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, они представляют собой клетки иммунной системы, такие как клетки врожденного или приобретенного иммунитета, например, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, как правило, Т-клетки и/или NK клетки. Другие иллюстративные клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Как правило, клетки являются первичными клетками, такими как клетки, выделенные непосредственно у индивидуума и/или выделенные у индивидуума и замороженные. В определенных вариантах осуществления клетки включают одно или несколько подмножеств Т-клеток или других типов клеток, например, целые популяции Т-клеток, $CD4^+$ -клетки, $CD8^+$ -клетки и их субпопуляции, такие как клетки, определенные посредством функции, состояния активации, зрелости, потенциалу к дифференцировке, росту, рециркуляции, локализации и/или способности к персистенции, антигенспецифичности, типа антигенного рецептора, нахождения в конкретном органе или компартменте, профиля секреции маркеров или цитокинов и/или степени дифференцировки. По отношению индивидуума, которого требуется подвергнуть лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. В способы включены стандартные способы. В определенных аспектах, например, для стандартных технологий, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, такими как стволовые клетки, такие как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). В определенных вариантах осуществления способы включают выделение клеток у индивидуума, их подготовку, обработку, культивирование и/или инженерию и их обратное введение тому же индивидууму до или после криоконсервации.

[0468] В подтипы и субпопуляции Т-клеток и/или $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток входят наивные Т-клетки (T_N), эффекторные Т-клетки ($T_{ЭФФ}$), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}), центральные Т-клетки памяти (T_{CM}), эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}) или конечно дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, ассоциированные со слизистой инвариантные Т-клетки (MAIT), натуральные и адаптивные регуляторные Т-клетки (T_{reg}), хелперные Т-клетки, такие как T_H1 клетки, T_H2 клетки, T_H3 клетки, T_H17 клетки, T_H9 клетки, T_H22 клетки, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

[0469] В определенных вариантах осуществления клетки представляют собой естественные киллерные (NK) клетки. В определенных вариантах осуществления клетки представляют собой моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

[0470] В определенных вариантах осуществления способы выделения включают разделение различных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или нескольких характеристических молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В определенных вариантах осуществления можно использовать любой известный способ разделения на основе таких маркеров. В определенных вариантах осуществления разделение представляет собой основанное на аффинности или на иммуноаффинности разделение. Например, в определенных аспектах выделение включает разделение клеток и популяций клеток на основе экспрессии или уровня экспрессии в клетках одного или нескольких маркеров, как правило, поверхностных клеточных маркеров, например, посредством инкубации с антителом или партнером по связыванию, которые специфически связываются с такими маркерами, как правило, с последующими этапами отмывки и разделения клеток со связанным антителом или партнером по связыванию и клеток, не связанных с антителом или партнером по связыванию.

[0471] В определенных вариантах осуществления выделение клеток включает один или несколько этапов подготовки и/или не основанных на аффинности этапов разделения клеток. В определенных примерах клетки отмывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или нескольких реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения требуемыми компонентами, лизиса или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В определенных примерах клетки разделяют на основе одного или нескольких свойств, таких как плотность, адгезивные свойства, размер, чувствительность и/или устойчивость к конкретным компонентам. В определенных вариантах осуществления способы включают основанные на плотности способы разделения клеток, такие как получение лейкоцитов из периферической крови посредством лизиса эритроцитов и центрифугирования в градиенте перколла или фиколла.

[0472] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере часть этапа отбор включает инкубацию клеток с реагентом для отбора. Инкубация с реагентом или реагентами для отбора, например, как часть способов отбора, которые можно проводить с использованием одного или нескольких реагентов для отбора для отбора одного или нескольких различных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке или на ней одной или нескольких характеристических молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В определенных вариантах осуществления можно использовать любой известный способ с использованием реагента или реагентов для отбора для разделения на основе таких маркеров. В определенных вариантах осуществления реагент или реагенты для отбора приводят к разделению, которое представляет собой основанное на аффинности или иммуноаффинности разделение. Например, отбор в определенных аспектах включает инкубацию с реагентом или реагентами для разделения клеток и популяций клеток на основе экспрессии или уровня экспрессии в клетках одного или нескольких маркеров, как

правило, поверхностных клеточных маркеров, например, посредством инкубации с антителом или партнером по связыванию, которые специфически связываются с такими маркерами, как правило, с последующими этапами отмывки и разделения клеток со связанным антителом или партнером по связыванию и клеток, не связанных с антителом или партнером по связыванию. В определенных вариантах осуществления отбор и/или другие аспекты процесса являются такими, как описано в публикации международной патентной заявки № WO/2015/164675.

[0473] В определенных аспектах таких процессов определенный объем клеток смешивают с определенным количеством требуемого реагента для основанного на аффинности отбора. Основанный на иммуноаффинности отбор можно проводить с использованием любой системы или способа, которые обеспечивают подходящее энергетическое взаимодействие разделяемых клеток и молекул, специфически связывающихся с маркером на клетке, например, антител или других партнеров по связыванию на твердой поверхности, например, частице. В определенных вариантах осуществления способы проводят с использованием частиц, таких как гранулы, например, магнитные гранулы, которые покрывают средством для отбора (например, антителом), специфичным к маркеру клеток. Частицы (например, гранулы) можно инкубировать или смешивать с клетками в контейнере, таком как пробирка или пакет, при встряске или смешивании с постоянным отношением плотности клеток и частиц (например, гранул) для помощи в поддержании энергетически предпочтительных взаимодействий. В других случаях способы включают отбор клеток, где весь или часть отбора проводят во внутреннем пространстве камеры центрифуги, например, в условиях центрифугирования. В определенных вариантах осуществления инкубацию клеток с реагентами для отбора, такими как основанными на иммуноаффинности реагентами для отбора, проводят в камере центрифуги. В определенных вариантах осуществления выделение или разделение проводят с использованием системы или устройства, описанного в публикации международной патентной заявки № WO2009/072003 или US 20110003380 A1. В одном из примеров, система представляет собой систему, как описано в международной публикации № WO2016/073602.

[0474] В определенных вариантах осуществления, проводя такие этапы отбора или их части (например, инкубацию с покрытыми антителами частицами, например, магнитными гранулами) в пространстве камеры центрифуги, пользователь может контролировать определенные параметры, такие как объем различных растворов, добавление раствора при обработке и ее сроки, что может обеспечивать преимущества по сравнению с другими доступными способами. Например, возможность уменьшать объем жидкости в пространстве при инкубации может увеличивать концентрацию частиц (например, реагента гранул), используемых при отборе и, таким образом, химический потенциал раствора, без влияния на общее количество клеток в пространстве. В свою очередь это может улучшить парные взаимодействия обрабатываемых клеток и частиц, используемых для отбора. В определенных вариантах осуществления проведение этапа

инкубации в камере, например, при ассоциации с системами, схемами и контролем, как описано в настоящем документе, позволяют пользователю проводить перемешивание раствора при инкубации в течение требуемого времени, что также может улучшить взаимодействие.

[0475] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере часть этапа отбора проводят в камере центрифуги, что включает инкубацию клеток с реагентом для отбора. В определенных аспектах таких процессов определенный объем клеток смешивают с определенным количеством требуемого реагента для основанного на аффинности отбора, которое является существенно меньшим, чем используют обычно при проведении подобных отборов в пробирке или контейнере для отбора того же количества клеток и/или объема клеток по инструкциям производителя. В определенных вариантах осуществления количество реагента или реагентов для отбора составляет не более 5%, не более 10%, не более 15%, не более 20%, не более 25%, не более 50%, не более 60%, не более 70% или не более 80% количества того же реагента(ов) для отбора, используемого для отбора клеток при инкубации в пробирке или контейнере для того же количества клеток и/или того же объема клеток по инструкциям производителя.

[0476] В определенных вариантах осуществления для отбора, например, основанного на иммуноаффинности отбора клеток, клетки инкубируют в пространстве камеры в композиции, которая также включает буфер для отбора с реагентом для отбора, таким как молекула, которая специфически связывается с поверхностным маркером на клетках, которые требуется обогащать и/или устранять, но не на других клетках в композиции, таким как антитело, которое необязательно связано с подложкой, такой как полимер или поверхность, например, гранула, например, магнитная гранула, такая как магнитные гранулы, связанные с моноклональными антителами, специфичными к CD4 и CD8. В определенных вариантах осуществления, как описано, реагент для отбора добавляют к клеткам в пространстве камеры в количестве, которого в значительной степени меньше (например, не более 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% от количества) по сравнению с количеством реагента для отбора, которое, как правило, используют или которое необходимо для достижения приблизительно такой же или сходной эффективности отбора того же количества клеток или того же объема клеток, когда отбор проводят в пробирке с перемешиванием или вращением. В определенных вариантах осуществления инкубацию проводят с добавлением к клеткам буфера для отбора и реагента для отбора с достижением заданного объема для инкубации реагента, например, 10 мл до 200 мл, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 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 определенных вариантах осуществления буфер для отбора и реагент для отбора перед добавлением к клеткам предварительно смешивают. В определенных вариантах осуществления буфер для отбора и реагент для отбора добавляют к клеткам отдельно. В определенных вариантах осуществления инкубацию для отбора проводят в условиях с периодическим осторожным перемешиванием, что

может помочь д обеспечении энергетически предпочтительных взаимодействий и, таким образом, обеспечивает применение меньше общего реагента для отбора при достижении высокой эффективности селекции.

[0477] В определенных вариантах осуществления общая длительность инкубации с реагентом для отбора составляет от 5 минут до 6 часов или приблизительно от 5 минут до приблизительно 6 часов, например, от 30 минут до 3 часов, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 30 минут, 60 минут, 120 минут или 180 минут.

[0478] В определенных вариантах осуществления инкубация как правило проводят в условиях перемешивания, например, при центрифугировании, как правило при относительно небольших ускорении или скорости, такой как скорость, меньшая, чем скорость используемая для осаждения клеток, например, от 600 об./мин. до 1700 об./мин. или приблизительно от 600 об./мин. до приблизительно 1700 об./мин. (например, точно или приблизительно или по меньшей мере 600 об./мин., 1000 об./мин., или 1500 об./мин. или 1700 об./мин.), например, при RCF образца или стенок камеры или другого контейнера от 80 g до 100 g или приблизительно от 80 g до приблизительно 100 g (например, точно или приблизительно или по меньшей мере 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В определенных вариантах осуществления центрифугирование проводят с повторными интервалами центрифугирования при такой низкой скорости с последующим периодом покоя, например, центрифугирование и/или покой в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, центрифугирование приблизительно в течение 1 или 2 секунд с последующим покоем в течение приблизительно 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0479] В определенных вариантах осуществления такой процесс проводят в полностью закрытой системе, с которой интегрирована камера. В определенных вариантах осуществления этот процесс (и в определенных аспектах также один или несколько дополнительных этапов, таких как предварительный этап отмывки с отмывкой содержащего клетки образца, такого как образец афереза) проводят в автоматизированном режиме так, что клетки, реагент и другие компоненты добавляют в камеру и удаляют из нее в соответствующие моменты времени и центрифугирование проводят так, чтобы завершить этап отмывки и связывания в одной закрытой системе с использованием автоматизированной программы.

[0480] В определенных вариантах осуществления после инкубация и/или смешивания клеток и реагента и/или реагентов для отбора, инкубируемые клетки подвергают разделению с отбором клеток на основе присутствия или отсутствия конкретных реагента или реагентов. В определенных вариантах осуществления разделение проводят в той же закрытой система, в которой проводили инкубацию клеток с реагентом для отбора. В определенных вариантах осуществления после инкубации с реагентами для отбора, инкубируемые клетки, включая клетки, с которыми связан реагент для отбора, переносят в систему для основанного на иммуноаффинности разделения клеток. В определенных вариантах осуществления система для основанного на

иммуноаффинности разделения представляет собой или содержит колонку для магнитного разделения.

[0481] Такие этапы разделения могут быть основаны на положительном отборе, при котором для дальнейшего использования сохраняют клетки со связанными реагентами, например, антителом или партнером по связыванию, и/или отрицательном отборе, при котором сохраняют клетки, не связанные с реагентом, например, антителом или партнером по связыванию. В определенных примерах для дальнейшего использования сохраняют обе фракции. В определенных аспектах отрицательный отбор может быть особенно пригодным, когда нет доступного антитела, которое специфически идентифицирует тип клеток в гетерогенной популяции так, что разделение лучше проводить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от требуемой популяции.

[0482] В определенных вариантах осуществления этапы процесса дополнительно включают отрицательный и/или положительный отбор инкубируемых клеток, например, с использованием системы или устройства, посредством которых можно проводить основанный на аффинности отбор. В определенных вариантах осуществления выделение проводят посредством обогащения конкретной клеткой популяцией посредством положительного отбора или обеднения конкретной клеточной популяцией посредством отрицательного отбора. В определенных вариантах осуществления положительный или отрицательный отбор проводят посредством инкубации клеток с одним или несколькими антителами или другим связывающим средством, которое специфически связывается с одним или несколькими из поверхностных маркеров, экспрессируемых (маркер⁺) или экспрессируемых на относительно высоком уровне (маркер^{high}) на отбираемых посредством положительного или отрицательного отбора клетках, соответственно. Можно проводить несколько раундов одного и того же этапа отбора, например, этапа положительного или отрицательного отбора. В определенных вариантах осуществления положительно или отрицательно отбирают фракцию, подвергаемую процессу отбора, например, повторяя этап положительного или отрицательного отбора. В определенных вариантах осуществления отбор повторяют дважды, трижды, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз или более девяти раз. В определенных вариантах осуществления один и тот же отбор проводят до пяти раз. В определенных вариантах осуществления один и тот же этап отбора проводят три раза.

[0483] Разделение не обязательно должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной клеточной популяции или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительный отбор или обогащение клетками конкретного типа, такими как клетки экспрессирующие маркер, относится к увеличению количества или процентного содержания таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Подобным образом, отрицательный отбор, удаление или обеднение клетками конкретного типа, такими как клетки экспрессирующие маркер,

относится к снижению количества или процентного содержания таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток.

[0484] В определенных примерах проводят несколько раундов этапов разделения, где положительно или отрицательно отобранную фракцию после одного этапа подвергают другому этапу разделения, такому как последующий положительный или отрицательный отбор. В определенных примерах один этап разделения может приводить к обеднению клетками, экспрессирующими несколько маркеров одновременно, например, посредством инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, где каждое специфично к маркеру, предназначенному для отрицательного отбора. Подобным образом, можно одновременно положительно отбирать несколько типов клеток посредством инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессируемых на различных типах клеток. В определенных вариантах осуществления один или несколько этапов разделения повторяют и/или проводят более одного раза. В определенных вариантах осуществления положительно или отрицательно отобранную фракцию, являющуюся результатом этапа разделения, подвергают тому же этапу разделения, например, повторяя этап положительного или отрицательного отбора. В определенных вариантах осуществления один этап разделения повторяют и/или проводят более одного раза, например, для увеличения выхода положительно отобранных клеток, для увеличения чистоты отрицательно отобранных клеток и/или для дополнительного удаления положительно отбираемых клеток из отрицательно отбираемой фракции. В определенных вариантах осуществления один или несколько этапов разделения проводят и/или повторяют два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз или более десяти раз. В определенных вариантах осуществления один или несколько этапов отбора проводят и/или повторяют от одного до десяти раз, от одного до пяти раз или от трех до пяти раз. В определенных вариантах осуществления один или несколько этапов отбора повторяют три раза.

[0485] Например, в определенных аспектах специфичные субпопуляции Т-клеток, таких как клетки позитивные или экспрессирующие высок уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клетки, выделяют способами положительного или отрицательного отбора. В определенных вариантах осуществления такие клетки выбирают посредством инкубации с одним или несколькими антителами или партнерами по связыванию, которое специфически связываются с такими маркерами. В определенных вариантах осуществления для проведения отбора антитело или партнер по связыванию можно конъюгировать, например, прямо или опосредовано, с твердой подложкой или матриксом, такими как магнитная гранула или парамагнитная гранула. Например, CD3+, CD28+ Т-клетки можно положительно отбирать с использованием конъюгированных со связывающим CD3 средством/связывающим CD28 средством магнитных гранул (например, гранулы DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander и/или ExpACT®).

[0486] В определенных вариантах осуществления Т-клетки отделяют от образца PBMC посредством отрицательного отбора маркеров, экспрессируемых клетками, не являющимися Т-клетками, такими как В-клетки, моноциты или другие лейкоциты, таких как CD14. В определенных аспектах для разделения CD4⁺ хелперных и CD8⁺ цитотоксических Т-клеток используют этап отбора CD4⁺ или CD8⁺. Такие популяции CD4⁺ и CD8⁺ можно дополнительно сортировать по субпопуляциям посредством положительного или отрицательного отбора по маркерам, экспрессируемым или экспрессируемым на относительно высоком уровне одной или несколькими субпопуляциями наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток.

[0487] В определенных вариантах осуществления CD8⁺ Т-клетки дополнительно обогащают или обедняют наивными клетками, центральными клетками памяти, эффекторными клетками памяти и/или центральными стволовыми клетками памяти, например, посредством положительного или отрицательного отбора на основе поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующими субпопуляциями. В определенных вариантах осуществления для увеличения эффективности, например, для увеличения длительности выживания, роста и/или приживления после введения, проводят обогащение центральными Т-клетками памяти (T_{CM}), которые в определенных аспектах являются особенно устойчивыми в таких субпопуляциях. См. Terakura et al., (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В определенных вариантах осуществления комбинированные обогащенные TCM CD8⁺ Т-клетки и CD4⁺ Т-клетки дополнительно увеличивают эффективность.

[0488] В вариантах осуществления Т-клетки памяти присутствуют в CD62L⁺ и CD62L⁻ подмножествах CD8⁺ лимфоцитах периферической крови. PBMC можно обогащать или обеднять фракциями CD62L-CD8⁺ и/или CD62L+CD8⁺, например, с использованием антител к CD8 и антител к CD62L.

[0489] В определенных вариантах осуществления обогащение центральными Т-клетками памяти (T_{CM}) основано на наличии или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; в определенных аспектах оно основано на отрицательном отборе клеток, экспрессирующих или на высоком уровне экспрессирующих CD45RA и/или гранзим В. В определенных аспектах выделение популяции CD8⁺, обогащенной клетками T_{CM} проводят посредством обеднения клетками, экспрессирующими CD4, CD14, CD45RA, и положительного отбора или обогащения клетками, экспрессирующими CD62L. В одном из аспектов обогащение центральными Т-клетками памяти (T_{CM}) проводят, начиная с отрицательной фракции клеток, отобранных на основе экспрессии CD4, которую подвергают отрицательному отбору на основе экспрессии CD14 и CD45RA и положительному отбору на основе CD62L.

[0490] Такие отборы в определенных аспектах проводят одновременно, а в других аспектах проводят последовательно, в любом порядке. В определенных аспектах один и тот же основанный на экспрессии CD4 этап отбора, используемый для получения популяций или субпопуляций CD8⁺ Т-клеток, также используют для получения

популяции или субпопуляции $CD4^+$ Т-клеток так, что положительную и отрицательную фракции после основанного на $CD4$ разделения сохраняют и используют на последующих этапах способов, необязательно после одного или нескольких дополнительно этапов положительного или отрицательного отбора. В определенных вариантах осуществления отбор популяции $CD4^+$ Т-клеток и отбор популяции $CD8^+$ Т-клеток проводят одновременно. В определенных вариантах осуществления отбор популяции $CD4^+$ Т-клеток и отбор популяции $CD8^+$ Т-клеток проводят последовательно, в любом порядке. В определенных вариантах осуществления способы отбора клеток могут включать способы, как описано в опубликованной заявке США № US20170037369. В определенных вариантах осуществления отобранную популяцию $CD4^+$ Т-клеток и отобранную популяцию $CD8^+$ Т-клеток после отбора можно комбинировать. В определенных аспектах отобранную популяцию $CD4^+$ Т-клеток и отобранную популяцию $CD8^+$ Т-клеток можно комбинировать в контейнере или пакете, например, в пакете биореактора. В определенных вариантах осуществления отобранную популяцию $CD4^+$ Т-клеток и отобранную популяцию $CD8^+$ Т-клеток обрабатывают отдельно, при этом отобранную популяцию $CD4^+$ Т-клеток обогащают $CD4^+$ Т-клетками и инкубируют со стимулирующим реагентом (например, магнитные гранулы со связывающим $CD3$ средством/связывающим $CD28$ средством), трансдуцируют вирусным вектором, кодирующим рекомбинантный белок (например, CAR) и культивируют в условиях роста Т-клеток, а отобранную популяцию $CD8^+$ Т-клеток обогащают $CD8^+$ Т-клетками и инкубируют со стимулирующим реагентом (например, магнитными гранулами со связывающим $CD3$ средством/связывающим $CD28$ средством), трансдуцируют вирусным вектором, кодирующим рекомбинантный белок (например, CAR), тот же рекомбинантный белок, что и при инженерии $CD4^+$ Т-клетки того же донора, и культивируют в условиях роста Т-клеток, например, предоставляемыми способами.

[0491] В конкретных вариантах осуществления биологический образец, например, образец РВМС или других лейкоцитов, подвергают отбору на $CD4^+$ Т-клетки, где сохраняют и отрицательную, и положительную фракции. В определенных вариантах осуществления из отрицательной фракция отбирают $CD8^+$ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления биологический образец подвергают отбору на $CD8^+$ Т-клетки, где сохраняют и отрицательную, и положительную фракции. В определенных вариантах осуществления из отрицательной фракция выбирают $CD4^+$ Т-клетки.

[0492] В конкретном пример образец РВМС или образец других лейкоцитов подвергают отбору на $CD4^+$ Т-клетки, где сохраняют и отрицательную, и положительную фракции. Затем отрицательную фракцию подвергают отрицательному отбору на основе экспрессии $CD14$ и $CD45RA$ или $CD19$ и положительному отбору на основе маркерной характеристики центральных Т-клеток памяти, такой как $CD62L$ или $CCR7$, где проводят положительный и отрицательный отборы в любом порядке.

[0493] Хелперные $CD4^+$ Т-клетки можно сортировать на наивные клетки, центральные клетки памяти и эффекторные клетки посредством идентификации

популяций клеток, которые несут клеточные поверхностные антигены. CD4⁺ лимфоциты можно получать стандартными способами. В определенных вариантах осуществления наивные CD4⁺ Т-лимфоциты также являются CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺ или CD4⁺ Т-клетками. В определенных вариантах осуществления центральные CD4⁺ Т-клетки памяти являются CD62L⁺ и CD45RO⁺. В определенных вариантах осуществления эффекторные CD4⁺ Т-клетки представляют собой CD62L⁻ и CD45RO⁻.

[0494] В одном из примеров для обогащения CD4⁺ Т-клетками посредством отрицательного отбора смесь моноклональных антител, как правило, включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В определенных вариантах осуществления для обеспечения разделения клеток посредством положительного и/или отрицательного отбора антитело или партнер по связыванию связаны с твердой подложкой или матриксом, такими как магнитные гранулы или парамагнитные гранулы. Например, в определенных вариантах осуществления клетки и популяции клеток разделяют или выделяют с использованием иммуномагнитные (или аффинномагнитные) способы разделения (рассмотренные 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).

[0495] В определенных аспектах образец или композиция клеток для разделения инкубируют с реагентом для отбора, содержащим небольшой, намагничиваемый или реагирующий на магнитное поле материал, такой как реагирующие на магнитное поле частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные гранулы (например, такие как гранулы Dynalbeads или MACS®). Реагирующий на магнитное поле материал, например, частица, как правило, непосредственно или опосредовано связана с партнером по связыванию, например, с антителом, которое специфически связывается с молекулой, например, поверхностным маркером, находящимся на клетке, клетках или популяции клеток, которые требуется разделять, например, который необходим для отрицательного или положительного отбора.

[0496] В определенных вариантах осуществления магнитные частица или гранула содержат реагирующий на магнитное поле материал, связанный с участником специфического связывания, таким как антитело или другой партнер по связыванию. Существует множество хорошо известных реагирующих на магнитное поле материалов для применения в способах разделения на основе магнитного поля. Подходящие магнитные частицы включают частицы, описанные в выданном Molday, патенте США № 4452773 и в описании патента Европы EP 452342 B, которые, таким образом, включены в качестве ссылки. Коллоидные частицы, такие как частицы, описанные в выданном Owen патенте США № 4795698 и в выданном Liberti et al., патенте США № 5200084 являются другим примером и их также можно использовать.

[0497] Как правило, инкубацию проводят в условиях, когда антитела или партнеры по связыванию или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты, которые специфически связываются с такими антителами или партнерами по связыванию,

которые связаны с магнитными частицами или гранулами, специфически связываются с клеточными поверхностными молекулами, если они присутствуют на клетках образца.

[0498] В определенных вариантах осуществления реагирующие на магнитное поле частицы покрывают первичными антителами или другими партнерами по связыванию, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В определенных вариантах осуществления магнитные частицы связывают с клетками посредством покрытия первичными антителами, специфичными к одному или нескольким маркерам. В определенных вариантах осуществления клетки, а не гранулы, метят первичным антителом или партнером по связыванию, а затем добавляют покрытые специфичными для типа клеток вторичными антителами или другими партнерами по связыванию (например, стрептавидином) магнитные частицы. В определенных вариантах осуществления используют покрытые стрептавидином магнитные частицы в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

[0499] В определенных аспектах разделение проводят способом, в котором образец помещают в магнитное поле, и клетки со связанными с ними реагирующими на магнитное поле или намагничиваемыми частицами связываются с магнитом и отделяются от немеченных клеток. Для положительного отбора сохраняют клетки, связанные с магнитом; для отрицательного отбора, сохраняют клетки, которые не связаны (немеченные клетки). В определенных аспектах комбинацию положительного и отрицательного отборов проводят в течение одного и того же этапа отбора, где сохраняют положительную и отрицательную фракции и дополнительно обрабатывают или подвергают дальнейшим этапам разделения.

[0500] В определенных вариантах осуществления основанный на аффинности отбор проводят посредством активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Активируемая магнитным полем сортировка клеток (MACS), например, системы CliniMACS, позволяют осуществлять отбор клеток со связанными с ними намагниченными частицами с большой чистотой. В определенных вариантах осуществления MACS действует в режиме, где последовательно элюируют нетребуемые и требуемые компоненты после приложения внешнего магнитного поля. Т.е., при элюции несвязанных компонентов клетки, связанные с магнитными частицами, удерживаются на месте. Затем, после завершения первого этапа элюции, компоненты, которые удерживало магнитное поле и предотвращало их элюцию, высвобождаются таким образом, что их можно элюировать и восстанавливать. В определенных вариантах осуществления не являющиеся мишенями клетки метят и устраняют из гетерогенной популяции клеток.

[0501] В определенных вариантах осуществления реагирующие на магнитное поле частицы остаются связанными с клетками, которые затем необходимо инкубировать, культивировать и/или подвергать инженерии; в определенных аспектах частицы остаются связанными с клетками для введения пациенту. В определенных вариантах осуществления намагничиваемые или реагирующие на магнитное поле частицы удаляют из клеток.

Способы удаления намагничиваемых частиц из клеток известны и включают, например, применение конкурирующих немеченых антител, намагничиваемых частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами, и т.д. В определенных вариантах осуществления намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

[0502] В определенных вариантах осуществления выделение или разделение проводят с использованием системы или устройства, на котором проводят один или несколько из этапов способов выделения, подготовки клеток, разделение, обработки, инкубации, культивирования и/или формулирования. В определенных аспектах систему используют для проведения каждого из этих этапов в закрытом или стерильном окружении, например, для минимизации ошибки, манипуляций пользователя и/или контаминации. В одном из примеров система представляет собой систему, как описано в публикации международной патентной заявки № WO2009/072003 или US 20110003380 A1.

[0503] В определенных вариантах осуществления в системе или устройстве один или несколько, например, все этапы выделения, обработки, инженерии и формулирования проводят в интегрированной или замкнутой системе и/или автоматизированным или программируемым образом. В определенных аспектах система или устройство включает компьютер и/или компьютерную программу, связанную с системой или устройством, которые позволяют пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или настраивать различные аспекты этапов обработки, выделения, инженерии и формулирования.

[0504] В определенных аспектах разделение и/или другие этапы проводят с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматизированного разделения клеток на клиническом масштабе в закрытой и стерильной системе. Компоненты могут включать интегрированный микрокомпьютер, блок магнитного разделения, перистальтический насос и различные запорные клапаны. В определенных аспектах интегрированный компьютер контролирует все компоненты устройства и направляет проведение системой повторяющихся процедур в стандартизированной последовательности. В определенных аспектах блок магнитного разделения включает подвижный постоянный магнит и держатель колонки для отбора. Перистальтический насос контролирует скорость потока на всем протяжении системы трубок и вместе с запорными клапанами, обеспечивает контролируемый поток буфера через систему и непрерывное суспендирование клеток.

[0505] В определенных аспектах в системе CliniMACS используют связанные с антителами намагничиваемые частицы, которые поставляются в стерильных, апиrogenных растворах. В определенных вариантах осуществления после мечения клеток магнитными частицами клетки отмывают для удаления избытка частиц. Затем пакет для подготовки клеток соединяют с системой трубок, которую в свою очередь соединяют с пакетом, содержащим буфер и пакетом для сбора клеток. Система трубок состоит из предварительно собранной стерильной системы трубок, включающей предколонку и

колонку для разделения, и предназначена только для одного применения. После начала программы разделения система автоматически вносит образец клеток в колонку для разделения. Меченые клетки сохраняют в колонке, тогда как немеченые клетки удаляют посредством серии этапов отмывки. В определенных вариантах осуществления популяции клеток для применения в способах, описываемых в настоящем документе, являются немечеными и не сохраняются в колонке. В определенных вариантах осуществления популяции клеток для применения в способах, описываемых в настоящем документе, являются мечеными и сохраняются в колонке. В определенных вариантах осуществления популяции клеток для применения в способах, описываемых в настоящем документе, элюируют из колонки после удаления магнитного поля и собирают в пакет для сбора клеток.

[0506] В определенных вариантах осуществления разделение и/или другие этапы проводят с использованием системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy в определенных аспектах оборудована блоком обработки клеток, который обеспечивает автоматизированные отмывку и фракционирование клеток посредством центрифугирования. Система CliniMACS Prodigy также может включать встроенную камеру и программное обеспечение распознавания изображений, которое определяет оптимальную конечную точку фракционирования клеток, распознавая макроскопические слои исходного клеточного продукта. Например, периферическую кровь автоматически разделяют на слои эритроцитов, лейкоцитов и плазмы. Система CliniMACS Prodigy также может включать интегрированную камеру для культивирования клеток, в которой проводят протоколы культивирования клеток, такие как, например, клеточную дифференцировку и рост, загрузку антигена и длительное культивирование клеток. Входные отверстия могут обеспечивать стерильное удаление и пополнение сред, а мониторинг клеток *can* можно проводить с использованием интегрированного 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.

[0507] В определенных вариантах осуществления популяцию клеток, описываемых в настоящем документе, собирают и обогащают (или обедняют) посредством проточной цитометрии, при которой клетки, окрашиваемые на несколько поверхностных клеточных маркеров вносят в жидкостную систему. В определенных вариантах осуществления популяцию клеток, описываемых в настоящем документе, собирают и обогащают (или обедняют) посредством сортировки в препаративном масштабе (FACS). В определенных вариантах осуществления популяцию клеток, описываемую в настоящем документе, собирают и обогащают (или обедняют), используя чипы микроэлектромеханических систем (MEMS) в комбинации с системой детекции на основе FACS (см., например, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; и Godin et al. (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376. В обоих случаях клетки можно метить несколькими маркерами, обеспечивающими выделение хорошо определенных подмножеств Т-клеток с высокой чистотой.

[0508] В определенных вариантах осуществления антитела или партнеры по связыванию мечены одним или несколькими детектируемыми маркерами для облегчения разделения для положительного и/или отрицательного отбора. Например, разделение можно проводить на основе связывания с флуоресцентно мечеными антителами. В определенных примерах разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров по связыванию, специфичных к одному или нескольким поверхностным клеточным маркерам проводят в потоке жидкости, например, посредством активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS), включая препаративный масштаб (FACS) и/или чипы микроэлектромеханических систем (MEMS), например, в комбинации с проточно-цитометрической системой детекции. Такие способы обеспечивают положительный и отрицательный отбор на основе нескольких маркеров одновременно.

[0509] В определенных вариантах осуществления способы подготовки включают этапы заморозки, например, криоконсервации, клеток до или после отбора, выделения, инкубации и/или проведения инженерии. В определенных вариантах осуществления способы включают этапы заморозки, например, криоконсервации, клеток до или после отбора выделения или обогащения. В определенных вариантах осуществления этап заморозки и последующей разморозки удаляет из популяции клеток гранулоциты и, в определенной степени, моноциты. В определенных вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для заморозки, например, после этапа отмывки для удаления плазмы и тромбоцитов. В определенных аспектах можно использовать любой из множества известных растворов и параметров для заморозки. Один пример включает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточный альбумин человека (HSA), или другую подходящую среду для заморозки клеток. Затем это разбавляют 1:1 средой так, что конечная концентрация DMSO и HSA составляет 10% и 4%, соответственно. Как правило, затем клетки замораживают до -80°C . при скорости 1° в минуту и хранят в газообразной фазе резервуара с жидким азотом. В определенных вариантах осуществления клетки помещают в пакет, подходящий для криоконсервации (например, CryoMacs® Freezing Bags, Miltenyi Biotec). В определенных вариантах осуществления клетки помещают во флакон, подходящий для криоконсервации (например, CellSeal® Vials, Cook Regentec). В определенных вариантах осуществления этапы и/или реагенты для заморозки представляют собой или включают любой из этапов и/или реагентов для заморозки, которые описаны в настоящем документе.

[0510] В определенных вариантах осуществления способов, описываемых в настоящем документе, образец (например, продукт афереза или лейкофереза) до отбора, выделения, инкубации и/или инженерии предпочтительно криоконсервировать для того, чтобы уменьшить, минимизировать или предотвратить гибель клеток. Неограничивающие способы криопротекции для уменьшения, минимизации или предотвращения гибели клеток и сохранения жизнеспособности клеток описаны ниже. В определенных вариантах осуществления образец, содержащий клетки (например, образец цельной крови, образец лейкоцитарного слоя, образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC),

образец нефракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкоафереза) подвергают криоконсервации и/или криопротекции (например, замораживают), а затем размораживают перед любым из этапов выделения, отбора, активации, стимуляции, инженерии, трансдукции, трансфекции, инкубации, культивирования, сбора, формулирования популяции клеток и/или введения формулированной популяции клеток индивидууму. В конкретных вариантах осуществления продукт афереза или продукт лейкоафереза подвергают криоконсервации и/или криопротекции (например, замораживают), а затем размораживают с последующим проведением этапа отбора или этапа выделения клеток (например, этап отбора или выделения Т-клеток), как описано выше. В определенных вариантах осуществления после того в подвергнутом криоконсервации и/или криопротекции продукте афереза или продукте лейкоафереза проводят этап отбора или выделения клеток (например, Т-клеток), дополнительного этапа криоконсервации и/или криопротекции во время или в промежутке между любыми из последующих этапов, таких как этапы активации, стимуляции, инженерии, трансдукции, трансфекции, инкубации, культивирования, сбора, формулирования популяции клеток и/или введения формулированной популяции клеток индивидууму, не проводят. Например, Т-клетки отобранные из размороженных подвергнутых криоконсервации и/или криопротекции продукта афереза или продукта лейкоафереза снова криоконсервации и/или криопротекции с последующей разморозкой для последующего процесса, такого как активация/стимуляция или трансдукция Т-клеток, не подвергают. В определенных вариантах осуществления после того как в подвергнутых криоконсервации и/или криопротекции продукте афереза или продукте лейкоафереза проводят этап отбора или выделения клеток (например, Т-клеток), проводят дополнительный этап криоконсервации и/или криопротекции в течение или в промежутке между любыми из последующих этапов, таких как этапы активации, стимуляции, инженерии, трансдукции, трансфекции, инкубации, культивирования, сбора, формулирования популяции клеток и/или введение формулированной популяции клеток индивидууму. Например, Т-клетки, выбранные из размороженных подвергнутых криоконсервации и/или криопротекции продукта афереза или продукта лейкоафереза снова подвергают криоконсервации и/или криопротекции с последующей разморозкой для последующего процесса, такого как активация/стимуляция или трансдукция Т-клеток.

[0511] В конкретных вариантах осуществления подвергнутые криоконсервации и/или криопротекции продукт афереза или продукт лейкоафереза помещают в банк (например, без отбора Т-клеток перед заморозкой образца), что в определенных аспектах может обеспечить большую гибкость для последующих этапов обработки. В одном из аспектов помещение клеток до отбора в банк увеличивает выходы клеток для дальнейшего процесса, и более раннее помещение клеток в банк может означать, что они являются более здоровыми и могут легче удовлетворять критериям успешного производства. В определенных вариантах осуществления помещенные в банк клетки

являются более устойчивыми на дополнительных этапах обработки, таких как этап или дополнительный этап получения или производства композиций клеток, по сравнению с клетками, которые не помещены в банк. В другом аспекте после разморозки, в подвергнутых криоконсервации и/или криопротекции продукте афереза или продукте лейкофереза можно проводить один или несколько различных способов отбора. Преимущества этого подхода наряду с другими заключаются в увеличении доступности, эффективности и/или улучшении других аспектов клеток для клеточной терапии для лечения заболевания или патологического состояния индивидуума, такого как донор образца и/или другой реципиент.

[0512] В определенных вариантах осуществления криоконсервацию образца крови, образца афереза или образца лейкофереза проводят в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 24, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 часов после получения образца у индивидуума. В вариантах осуществления криоконсервацию образца крови, образца афереза или образца лейкофереза проводят в пределах 1 суток, 2 суток или 3 суток после получения образца у индивидуума.

[0513] В определенных вариантах осуществления образец, содержащий клетки (например, образец крови, продукт афереза или продукт лейкофереза) отмывают для удаления одного или нескольких антикоагулянтов, таких как гепарин, добавляемых при аферезе или лейкоферезе. В определенных вариантах осуществления образец (например, образец крови, образец афереза, образец лейкофереза) проходит отбор, выделение и/или обогащение и отобранные, выделенные и/или обогащенные клетки подвергают криоконсервации. В определенных вариантах осуществления выделенные, отобранные и/или обогащенные клетки представляют собой Т-клетки, такие как любые Т-клетки, описываемые в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления обогащенные композиции Т-клеток после выделения, отбора и/или обогащения замораживают, например, подвергают криоконсервации и/или подвергают криообработке. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных CD4⁺ Т-клеток замораживают, например, подвергают криоконсервации и/или подвергают криообработке, после выделения, отбора и/или обогащения. В определенных вариантах осуществления композицию обогащенных CD8⁺ Т-клеток замораживают, например, подвергают криоконсервации и/или подвергают криообработке, после выделения, отбора и/или обогащения. В определенных вариантах осуществления обогащенные Т-клетки замораживают, например, подвергают криоконсервации и/или подвергают криообработке, до любого из этапов инкубации, активации, стимуляции, инженерии, трансдукции, трансфекции, культивирования, наращивания, сбора и/или формулирования композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных CD4⁺ Т-клеток замораживают, например, подвергают криоконсервации и/или подвергают криообработке, до любого из этапов инкубации, активации, стимуляции, инженерии, трансдукции, трансфекции, культивирования, наращивания, сбора и/или формулирования композиции клеток. В определенных вариантах осуществления композицию обогащенных CD8⁺ Т-

клеток замораживают например, подвергают криоконсервации и/или подвергают криообработке, до любого из этапов инкубации, активации, стимуляции, инженерии, трансдукции, трансфекции, культивирования, наращивания, сбора и/или формулирования композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления одну или несколько подвергнутых криообработке входящих композиций хранят, например, при или приблизительно при -80°C , в течение периода от 12 часов до 7 суток, от 24 часов до 120 часов или от 2 суток до 5 суток. В конкретных вариантах осуществления одну или несколько подвергнутых криообработке входящих композиций хранят при или приблизительно при -80°C , в течение периода времени менее 10 суток, 9 суток, 8 суток, 7 суток, 6 суток, или 5 суток, 4 суток, 3 суток, 2 суток или 1 суток. В определенных вариантах осуществления одну или несколько подвергнутых криообработке входящих композиций хранят при или приблизительно при -80°C , в течение или приблизительно в течение 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток или 6 суток.

[0514] В определенных вариантах осуществления образец (например, образец афереза или лейкофереза) собирают и подвергают криоконсервации и/или криопротекции до или без предшествующего отбора клеток (например, без предшествующего отбора Т-клеток, такого как отбор посредством хроматографии) в момент после диагностики у донора заболевания или патологического состояния. В определенных аспектах момент криоконсервации также выбирают до того, как донор получит одно или несколько из следующего: любое начальное лечение заболевания или патологического состояния, любое направленное лечение или любое лечение, предназначенное для лечения заболевания или патологического состояния, или любое лечение, отличное от радиации и/или химиотерапии. В определенных вариантах осуществления образец собирают после первого рецидива заболевания после начального лечения заболевания и перед получением донором или индивидуумом последующего лечения заболевания. Начальное и/или последующее лечение может представлять собой терапевтическое средство, отличное от клеточного терапевтического средства. В определенных вариантах осуществления собранные клетки можно использовать в клеточной терапии после начального и/или последующего лечения. В одном из аспектов подвергнутый криоконсервации и/или криопротекции без предшествующего отбора клеток образец может помочь уменьшить начальные расходы, такие как расходы, связанные с не получающими лечения пациентами в рандомизированном клиническом испытании, которые могут пересекаться и нуждаться в лечении позже.

[0515] В определенных вариантах осуществления образец (например, образец афереза или лейкофереза) собирают и подвергают криоконсервации и/или криопротекции до или без предшествующего отбора клеток (например, без предшествующего отбора Т-клеток, такого как отбор посредством хроматографии) в момент после второго рецидива заболевания после второй линии лечения заболевания и перед получением донором или индивидуумом последующего лечения заболевания. В определенных вариантах осуществления у пациентов определяют наличие вероятности рецидива после второй

линии лечение, например, посредством оценки определенных факторов риска. В определенных вариантах осуществления факторы риска основаны на типе и/или генетике заболевания, такого как двухударная лимфома, первично устойчивая злокачественная опухоль или лимфома из активированных В-клеток. В определенных вариантах осуществления факторы риска основаны на клиническом проявлении, таком как ранний рецидив после первой линии лечения или другие индикаторы плохого прогноза после лечения (например, IPI (международный прогностический индекс) > 2).

[0516] В определенных вариантах осуществления образец (например, образец афереза или лейкофереза) собирают и подвергают криоконсервации и/или криопротекции до или без предшествующего отбора клеток (например, без предшествующего отбора Т-клеток, такого как отбор посредством хроматографии) в момент до диагностики заболевания у донора или индивидуума. В определенных аспектах наличие у донора или индивидуума можно определять риск развития заболевания. В определенных аспектах донор или индивидуум может быть здоровым индивидуумом. В определенных случаях донор или индивидуум может принять решение о помещении клеток в банк или хранилище без наличия риска развития заболевания или диагноза заболевания в случае, если клеточная терапия необходима на поздней стадии жизни. В определенных вариантах осуществления у донора или индивидуума можно полагать наличие риска развития заболевания на основе таких факторов, как генетические мутации, генетические аномалии, генетические нарушения, семейный анамнез, белковые аномалии (такие как дефицит продукции и/или процессинга белка) и выбор стиля жизни, который может увеличивать риск развития заболевания. В определенных вариантах осуществления клетки собирают в качестве профилактики.

[0517] Если позволить донорам хранить свои клетки на стадии, когда доноров и, таким образом, их клетки не подвергали значительному лечению заболевания и/или до начала заболевания или патологического состояния или их диагностики, такие клетки могут иметь определенные преимущества для использования в клеточной терапии по сравнению с клетками, полученными после одного или после нескольких раундов лечения. Например, клетки, полученные до одного или нескольких раундов лечения, могут быть более жизнеспособными, могут демонстрировать более высокие уровни определенных видов клеточной активности, могут более быстро расти и/или могут лучше воспринимать генетические манипуляции чем клетки, которые перенесли несколько раундов лечения. Другой пример преимущества вариантов осуществления, описываемых в настоящем документе, может включать удобство. Например, благодаря сбору, необязательной обработке и хранению клеток донора до того, как они понадобятся для клеточной терапии, эти клетки могли бы быть легкодоступны, если и когда у реципиента в дальнейшем возникнет в них необходимость. Это может увеличить возможности лаборатории афереза, предоставляя техническим специалистам большую гибкость в планировании процесса сбора при аферезе.

[0518] В определенных вариантах осуществления подвергнутые криоконсервации клетки (например, отобранные клетки или клетки в образце (например, образце крови, образце афереза, образце лейкофереза)) можно хранить в течение периода до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 суток или периода до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 недель, или в течение периода по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или в течение периода более 8 недель. В определенных вариантах осуществления подвергнутые криоконсервации клетки (например, отобранные клетки или клетки в образце (например, образце крови, образце афереза, образце лейкофереза)) можно хранить в течение периода более чем или приблизительно 1 месяц, 2 месяца, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев или более. После хранения клетки (например, отобранные клетки или клетки в образце (например, образце крови, образце афереза, образце лейкофереза)) можно размораживать, и обработку можно возобновлять с той же точки процесса. В определенных вариантах осуществления клетки подвергают криопротекции и до последующей дополнительной обработки, например, инкубации в стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления культивируемые и/или формулируемые популяции клетки подвергают криопротекции и хранят до введения индивидууму, например, в качестве аутологичной клеточной терапии.

[0519] В конкретных вариантах осуществления клетки замораживают, например, после этапа отмывки, например, для удаления плазмы и тромбоциты. В определенных вариантах осуществления клетки замораживают до, после и/или в течение любого из этапов, связанных с производством и/или получением клеток, например, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, CAR. В определенных вариантах осуществления такие этапы могут включать любые этапы, связанные с получением подвергнутых инженерии клеток, включая в качестве неограничивающих примеров отбор и/или выделение подмножества клеток, например, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток, стимуляцию и/или наращивание клеток, например, Т-клеток или их подмножества, или трансфекцию или трансдукцию клеток. В определенных вариантах осуществления клетки представляют собой клетки образца афереза, получаемые у индивидуума перед отбором и/или выделением клеток, стимуляцией и/или наращиванием клеток, или трансфекцией или трансдукцией клеток. В конкретных вариантах осуществления клетки замораживают после завершения процесса инженерии, например, после процесса, включающего один или несколько из этапов выделения, отбора, стимуляции, активации, трансдукции, трансфекции и/или наращивания.

[0520] В определенных вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для заморозки, например, криопротекторе и/или растворе, содержащем криопротектор. В определенных аспектах можно использовать любой из множества известных растворов для заморозки и параметров, включая растворы для заморозки, содержащие среды или растворы для криоконсервации или стеклования, содержащие криопротектор. Подходящие криопротекторы в качестве неограничивающих примеров включают диметилсульфоксид (DMSO), глицерин, гликоль, пропиленгликоль, этиленгликоль,

пропандиол, полиэтиленгликоль (PEG), 1, 2-пропандиол (PROH) или их смесь. В определенных примерах раствор для криоконсервации может содержать один или несколько не проникающих в клетку криоконсервантов, включая в качестве неограничивающих примеров, поливинилпирролидон, гидроксиптилкрахмал, полисахарид, моносахарид, альгинат, трегалозу, раффинозу, декстран, сывороточный альбумин человека, фикоилл, липопотеины, поливинилпирролидон, гидроксиптилкрахмал, аутологичную плазму или их смесь. В определенных вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для заморозки с конечной концентрацией криопротектора приблизительно от 1% до приблизительно 20%, приблизительно от 3% до приблизительно 9% или приблизительно от 6% до приблизительно 9% по объему, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления конечная концентрация криопротектора в растворе для заморозки составляет приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 5,5%, приблизительно 6%, приблизительно 6,5%, приблизительно 7%, приблизительно 7,5%, приблизительно 8%, приблизительно 8,5%, приблизительно 9%, приблизительно 9,5%, или приблизительно 10% по объему.

[0521] В определенных вариантах осуществления клетки, например, замораживают при конкретной плотности клеток, например, известной или контролируемой плотности клеток. В определенных вариантах осуществления плотность клеток в течение процесса заморозки может влиять на гибель клеток и/или повреждение клеток, которые происходят в течение и/или вследствие процесса заморозки. Например, в конкретных вариантах осуществления плотность клеток влияет на равновесие, например, осмотическое равновесие с окружением в течение процесса заморозки. В определенных вариантах осуществления это равновесие представляет собой, включает и/или приводит к обезвоживанию. В определенных вариантах осуществления обезвоживание представляет собой или включает обезвоживание клеток, которое происходит при приведении в контакт, комбинации и/или инкубации с раствором для заморозки, например, DMSO и/или содержащим DMSO раствором. В конкретных вариантах осуществления обезвоживание представляет собой или включает обезвоживание являющегося результатом образования центров кристаллизации и увеличения кристаллов льда во внеклеточном пространстве, например, вследствие уменьшения снижения эффективной концентрации жидкой воды, доступной клеткам. В определенных вариантах осуществления клетки замораживают при плотности клеток, которая приводит к более медленному и/или менее быстрому обезвоживанию, чем у клеток, которые замораживают при другой, например, большей или меньшей плотности клеток. В определенных вариантах осуществления клетки замораживают при плотности клеток, которая приводит приблизительно, по меньшей мере или к более медленному обезвоживанию, чем у клеток замораживаемых при другой плотности клеток, например, большей или меньшей, в тех же или сходных условиях, на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, в 1 раз, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 50 раз или в 100 раз.

[0522] В определенных вариантах осуществления криопротектор представляет собой DMSO. В конкретных вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для заморозки с конечной концентрацией DMSO приблизительно от 1% до приблизительно 20%, приблизительно от 3% до приблизительно 9% или приблизительно от 6% до приблизительно 9% по объему, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления конечная концентрация DMSO в растворе для заморозки составляет приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 5,5%, приблизительно 6%, приблизительно 6,5%, приблизительно 7%, приблизительно 7,5%, приблизительно 8%, приблизительно 8,5%, приблизительно 9%, приблизительно 9,5% или приблизительно 10% по объему.

[0523] В конкретных вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для заморозки при плотности от или приблизительно от $0,1 \times 10^6$ клеток/мл до приблизительно 5000×10^6 клеток/мл, от или приблизительно от 1×10^6 клеток/мл до приблизительно 500×10^6 клеток/мл, от или приблизительно от 5×10^6 клеток/мл до приблизительно 150×10^6 клеток/мл, от или приблизительно от 10×10^6 клеток/мл до приблизительно 70×10^6 клеток/мл, или от или приблизительно от 15×10^6 клеток/мл до приблизительно 60×10^6 клеток/мл, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления клетки являются жизнеспособными клетками.

[0524] В определенных вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для заморозки при плотности от или приблизительно от 1×10^6 клеток/мл и приблизительно 1×10^8 клеток/мл, приблизительно от 1×10^6 клеток/мл и приблизительно 2×10^7 клеток/мл, приблизительно от 1×10^7 клеток/мл и приблизительно 5×10^7 клеток/мл, или приблизительно от 1×10^7 клеток/мл и 5×10^7 клеток/мл, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для заморозки при плотности приблизительно 1×10^6 клеток/мл, приблизительно 2×10^6 клеток/мл, приблизительно 5×10^6 клеток/мл, приблизительно 1×10^7 клеток/мл, приблизительно $1,5 \times 10^7$ клеток/мл, приблизительно 2×10^7 клеток/мл, приблизительно $2,5 \times 10^7$ клеток/мл, приблизительно $2,5 \times 10^7$ клеток/мл, приблизительно 3×10^7 клеток/мл, приблизительно $3,5 \times 10^7$ клеток/мл, приблизительно 4×10^7 клеток/мл, приблизительно $4,5 \times 10^7$ клеток/мл, или приблизительно 5×10^7 клеток/мл, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для заморозки при плотности приблизительно от $1,5 \times 10^7$ клеток/мл и приблизительно 6×10^7 клеток/мл, включительно. В определенных вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для заморозки при плотности по меньшей мере приблизительно 1×10^7 клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для заморозки при плотности по меньшей мере приблизительно $1,5 \times 10^7$ клеток/мл. В определенных вариантах осуществления клетки являются жизнеспособными клетками.

[0525] В определенных вариантах осуществления клетки замораживают в контейнере. В определенных вариантах осуществления контейнер представляет собой

контейнер для заморозки и/или криопротекторный контейнер. Контейнеры, подходящие для криозаморозки в качестве неограничивающих примеров включают флаконы, пакеты, например, пластиковые пакеты и тростины. В конкретных вариантах осуществления клетки, например, клетки одной и той же композиции клеток, такой как композиция клеток, содержащая экспрессирующие CAR клетки, замораживают в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, или более 10 отдельных контейнерах. Например, в определенных вариантах осуществления клетки и/или композицию клеток суспендируют в объеме, например, таком как раствор, раствор для заморозки и/или криопротектор, и который превышает объем, подходящий для контейнера, и, таким образом, объем помещают в два или более контейнеров. В определенных вариантах осуществления объем составляет приблизительно или менее 100 мл, 50 мл, 25 мл, 20 мл, 15 мл, 10 мл, 5 мл или менее 5 мл, и клетки замораживают в двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более десяти отдельных флаконах. В конкретных вариантах осуществления в каждый флакон помещают одинаковый объем клеток. В определенных вариантах осуществления флаконы являются идентичными флаконами, например, флаконами одной и той же марки, модели и/или производственной партии. В конкретных вариантах осуществления объем составляет приблизительно или более 10 мл, 15 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 120 мл, 150 мл, 200 мл или более 200 мл, и клетки замораживают в двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более десяти отдельных пакетах. В конкретных вариантах осуществления в каждый пакет помещают одинаковый объем клеток. В определенных вариантах осуществления пакеты являются идентичными пакетами, например, пакетами одной и той же марки, модели и/или производственной партии.

[0526] В определенных вариантах осуществления контейнер представляет собой флакон. В определенных вариантах осуществления контейнер представляет собой флакон с объемом наполнения точно, приблизительно или по меньшей мере 0,5 мл, 1 мл, 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл, 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл, 10 мл, 11 мл, 12 мл, 13 мл, 14 мл, 15 мл, 16 мл, 17 мл, 18 мл, 19 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 35 мл, 40 мл, 45 мл или 50 мл. В определенных вариантах осуществления объем наполнения флакона составляет от 1 мл до 120 мл, от 1 мл до 20 мл, от 1 мл до 5 мл, от 1 мл до 10 мл, от 1 мл до 40 мл или от 20 мл до 40 мл, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления флакон представляет собой замораживаемый флакон, криопротекторный флакон и/или криофлакон. Подходящие флаконы известны, и в качестве неограничивающих примеров включают флаконы CellSeal® (Cook Regentec) и флаконы, описанные в патенты США №№ US 8936905, US 9565854 и US 8709797, включенные, таким образом, в качестве ссылки полностью.

[0527] В конкретных вариантах осуществления контейнер представляет собой пакет. В определенных вариантах осуществления контейнер представляет собой пакет с объемом наполнения точно, приблизительно или по меньшей мере 0,5 мл, 1 мл, 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл, 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл, 10 мл, 11 мл, 12 мл, 13 мл, 14 мл, 15 мл, 16 мл, 17 мл, 18

мл, 19 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 35 мл, 40 мл, 45 мл или 50 мл. В определенных вариантах осуществления объем наполнения пакета составляет от 1 мл до 120 мл, от 1 мл до 20 мл, от 1 мл до 5 мл, от 1 мл до 40 мл, от 20 мл до 40 мл, от 1 мл до 70 мл или от 50 мл до 70 мл, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления пакет заполнен объемом точно, приблизительно или менее 100 мл, 75 мл, 70 мл, 50 мл, 25 мл, 20 мл или 10 мл. Подходящие пакеты известны и в качестве неограничивающих примеров включают CryoMacs® Freezing Bags (Miltenyi Biotec). В определенных вариантах осуществления представляет собой объем при комнатной температуре. В определенных вариантах осуществления объем представляет собой объем от 37°C до 4°C, от 16°C до 27°C, включительно, или при, приблизительно при или по меньшей мере при 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C или 37°C. В определенных вариантах осуществления объем представляет собой объем при 25°C.

[0528] В определенных вариантах осуществления клетки в объеме среды или раствора, например, раствора для заморозки, от 1 мл до 20 мл замораживают в одном или нескольких флаконах, включительно. В определенных вариантах осуществления объем наполнения одного или нескольких флаконов составляет от 1 мл до 5 мл, включительно. В определенных вариантах осуществления клетки в объеме среды или раствора, например, раствора для заморозки от 20 мл до 120 мл, включительно, замораживают в одном или нескольких пакетах. В конкретных вариантах осуществления один или несколько объем наполнения пакетов составляет от 20 мл до 40 мл, включительно. В определенных вариантах осуществления клетки в объеме среды или раствора, например, раствора для заморозки 120 мл или более замораживают в одном или нескольких пакетах. В определенных вариантах осуществления объем наполнения одного или нескольких пакетов составляет от 50 мл до 70 мл, включительно.

[0529] В определенных вариантах осуществления клетки замораживают в растворе, например, растворе для заморозки, который помещают в контейнер, например, пакет или флакон, с определенным отношением площади поверхности к объему. В конкретных вариантах осуществления отношение площади поверхности к объему составляет от или приблизительно от $0,1 \text{ см}^{-1}$ до 100 см^{-1} ; от 1 см^{-1} до 50 см^{-1} , от 1 см^{-1} до 20 см^{-1} , от 1 см^{-1} до 10 см^{-1} , от 2 см^{-1} до 10 см^{-1} , от 3 см^{-1} до 7 см^{-1} или от 3 см^{-1} до 6 см^{-1} , каждое включительно. В конкретных вариантах осуществления отношение площади поверхности к объему составляет от или приблизительно от 3 см^{-1} до 6 см^{-1} . В определенных вариантах осуществления отношение площади поверхности к объему составляет приблизительно или по меньшей мере 3 см^{-1} , 4 см^{-1} , 5 см^{-1} , 6 см^{-1} или 7 см^{-1} .

[0530] В определенных вариантах осуществления перенос в среду для криоконсервации связан с одним или несколькими этапами обработки, которые могут включать отмывку образца, например, композиции с подвергнутыми инженерии клетками, например, для удаления среды и/или помещение клеток в соответствующие буфер или среду для криоконсервации для последующей заморозки. В определенных

вариантах осуществления перенос в среду для криоконсервации на уровне клинического масштаба полностью автоматизирован в закрытой и стерильной системе. В определенных вариантах осуществления перенос в среду для криоконсервации проводят с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec).

[0531] В определенных вариантах осуществления клетки размораживают. В конкретных вариантах осуществления клетки быстро размораживают, например, настолько быстро, насколько возможно без перегрева клеток или подвергания клеток действию высоких температур, например, выше 37°C. В определенных вариантах осуществления быстрое размораживание снижает и/или предотвращает действие на клетки высоких концентраций криопротектора и/или DMSO. В конкретных вариантах осуществления на скорость, при которой проводят разморозку, могут влиять свойства контейнера, например, флакона и/или пакета, в которых клетки замораживают и размораживают. В конкретных вариантах осуществления клетки размораживают при температуре точно, приблизительно или менее 37°C, 35°C, 32°C, 30°C, 29°C, 28°C, 27°C, 26°C, 25°C, 24°C, 23°C, 22°C, 21°C, 20°C или 15°C, или от 15°C до 30°C, от 23°C до 28°C или от 24°C до 26°C, каждое включительно. В определенных вариантах осуществления клетки размораживают на термоблоке или в водяной бане. В определенных вариантах осуществления клетки не размораживают на термоблоке или водяной бане. В определенных вариантах осуществления клетки размораживают при комнатной температуре. В определенных вариантах осуществления на скорость разморозки клеток влияет толщина стенок контейнера, например, клетки в контейнерах с толстыми стенками размораживаются с меньшей скоростью, чем клетки в контейнерах с более тонкими стенками. В определенных вариантах осуществления контейнеры с низким отношением площади поверхности к объему имеют низкую и/или неравномерную скорость разморозки. В определенных вариантах осуществления подвергнутые криоконсервации клетки быстро размораживают в контейнере, у которого отношение площади поверхности к объему составляет приблизительно, или составляет по меньшей мере 1 см⁻¹, 2 см⁻¹, 3 см⁻¹, 4 см⁻¹, 5 см⁻¹, 6 см⁻¹ или 7 см⁻¹, 8 см⁻¹, 9 см⁻¹ или 10 см⁻¹. В конкретных вариантах осуществления клетки размораживают в течение, приблизительно в течение, или менее чем за 120 минут, 90 минут, 60 минут, 45 минут, 30 минут, 25 минут, 20 минут, 15 минут или десять минут. В определенных вариантах осуществления клетки размораживают в течение периода от 10 минут до 60 минут, от 15 минут до 45 минут или от 15 минут до 25 минут, каждое включительно. В конкретных вариантах осуществления клетки размораживают в течение, приблизительно в течение или менее чем за 20 минут.

[0532] В определенных вариантах осуществления размороженные клетки до введения или до любого из последующих этапов инженерии и/или обработки находятся в покое, например, их инкубируют или культивируют. В определенных вариантах осуществления клетки находятся в покое в небольшом и/или недетектируемом количестве криопротектора или без криопротектора, например, DMSO. В конкретных вариантах осуществления размороженные клетки находятся в покое после или непосредственно

после этапов отмывки, например, для удаления криопротектора и/или DMSO. В определенных вариантах осуществления состояние покоя представляет собой или включает культивирование и/или инкубацию при или приблизительно при 37°C. В определенных вариантах осуществления состояние покоя осуществляют в отсутствие любых реагентов, например, стимулирующих реагентов, реагентов для гранул или рекомбинантных цитокинов, используемых на любом этапе обработки или инженерии и/или связанных с ним. В определенных вариантах осуществления клетки находятся в покое в течение, приблизительно в течение, или в течение по меньшей мере 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 1 час, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 18 часов или 24 часов. В определенных вариантах осуществления клетки находятся в покое в течение, приблизительно в течение, или в течение по меньшей мере 2 часов.

[0533] В определенных вариантах осуществления клетки замораживают, например, подвергают криоконсервации, до, в течение или после указанных способов обработки и/или инженерии клетки. В определенных вариантах осуществления этапы заморозки и последующей разморозки удаляют гранулоциты и, в определенной степени, моноциты в популяции клеток. Как правило клетки затем замораживают до -80°C. при скорости 1° в минуту и хранят в газообразной фазе резервуара жидкого азота. В определенных вариантах осуществления клетки активно и/или эффективно охлаждают при скорости точно или приблизительно 1° в минуту с использованием замораживателя с контролем скорости заморозки. В определенных вариантах осуществления клетки можно замораживать с использованием замораживателя с контролем скорости заморозки. В определенных аспектах замораживатели с контролем скорости заморозки используют для заморозки клеток с программируемыми профилями охлаждения, например, профилями с несколькими скоростями охлаждения и/или заморозки. Такие профили заморозки можно запрограммировать для контроля образования центров кристаллизации, например, образования льда, например, для снижения формирования внутриклеточного льда.

[0534] В определенных вариантах осуществления характеристики замороженных клеток, включающих любые клетки и композиции, как описано, такие как клеточные композиции с конкретной концентрацией или плотностью клеток, замороженные в присутствии криопротектора и/или помещенные в контейнер с определенным объемом или отношение поверхности к объему, включают улучшенный, увеличенный и/или более быстрый рост; улучшенную, увеличенную и/или повышенную жизнеспособность клеток и сниженную частоту гибели клеток, например некроза, программируемой гибели клеток и/или апоптоза; улучшенную, усиленную и/или повышенную активность, например цитолитическую активность; и/или сниженная частота случаев старения или покоя после разморозки, по сравнению с клетками, замороженными альтернативными способами.

[0535] В конкретных вариантах осуществления клетки замораживают при плотности клеток и/или отношении площади поверхности к объему, предоставленными в настоящем документе, и они демонстрируют сниженную гибель клеток, например, некроз и/или апоптоз, при заморозке, криозаморозке и/или криоконсервации и/или в их

результате, по сравнению с клетками, замороженными при другой плотности клеток и/или другом отношении площади поверхности к объему в тех же или сходных условиях. В конкретных вариантах осуществления клетки замораживают при плотности клеток и/или отношении площади поверхности к объему, предоставленными в настоящем документе, и они демонстрируют сниженную отсроченную гибель клеток, например, уменьшение количества клеток, которые погибают, например, вследствие некроза, программируемой гибели клеток или апоптоза в пределах 48 часов после заморозки, криозаморозки и/или криоконсервации, например, после разморозки замороженных клеток. В определенных вариантах осуществления при заморозке и/или криоконсервации и/или в их результате погибает по меньшей мере или приблизительно погибает на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 99% меньше клеток по сравнению с клетками, которые замораживают при другой плотности клеток и/или другом отношении площади поверхности к объему в тех же или сходных условиях. В определенных вариантах осуществления при заморозке, криозаморозке и/или криоконсервации или в их результате погибает менее 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,1% или 0,01% клеток, замороженных при указанных плотности клеток и/или отношении площади поверхности к объему.

[0536] В определенных вариантах осуществления клетки замораживают при плотности клеток и/или отношении площади поверхности к объему, предоставленными в настоящем документе, и они демонстрируют уменьшенное количество случаев старения или покоя вследствие и/или в результате заморозки, криозаморозки и/или криоконсервации, по сравнению с клетками, замороженными при другой плотности клеток и/или другом отношении площади поверхности к объему в тех же или сходных условиях. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере или приблизительно на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 99% меньше клеток являются стареющими и/или покоящимися клетками по сравнению с клетками, замороженными при другой плотности клеток и/или другом отношении площади поверхности к объему в тех же или сходных условиях. В определенных вариантах осуществления клетки замораживают при указанных плотности клеток и/или отношении площади поверхности к объему и менее 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,1% или 0,01% клеток становятся стареющими и/или покоящимися в результате заморозки, криозаморозки и/или криоконсервации.

[0537] В определенных вариантах осуществления клетки замораживают, например, подвергают криоконсервации, при плотности клеток и/или отношении площади поверхности к объему, предоставленными в настоящем документе, и они демонстрируют улучшенный и/или более быстрый рост, например, в стимулирующих условиях, например, при инкубации со стимулирующим реагентом, описываемым в настоящем документе, после разморозки клеток по сравнению с клетками, замороженными при другой плотности клеток и/или отношении площади поверхности к объему в тех же или сходных условиях. В конкретных вариантах осуществления клетки растут при скорости, которая является

более быстрой точно, приблизительно, или по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, в 1 раз, 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз или в 10 раз по сравнению с клетками, замороженными при другой плотности клеток и/или другом отношении площади поверхности к объему в тех же или сходных условиях. Например, в определенных вариантах осуществления размороженные клетки достигают порогового значения наращивания, например, заданного количества, плотности или коэффициента роста клеток, например, 2-кратного роста точно, приблизительно или по меньшей мере за время, на 5% 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньшее, чем у размороженных клеток, которые размораживали при другой плотности клеток и/или другом отношении площади поверхности к объему в тех же или сходных условиях.

[0538] В определенных вариантах осуществления клетки заморожены, например, подвергнуты криоконсервации, при определенной плотности клеток, и после разморозки клеток обладают улучшенной, повышенной и/или большей цитолитической активностью, например, как измеряют любым анализом определения цитолитической активности, описываемом в настоящем документе, по сравнению с клетками, замороженными с другой плотностью клеток, например с более высокой или меньшей плотностью, в тех же или аналогичных условиях. В конкретных вариантах осуществления цитолитическая активность увеличена точно, приблизительно или по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, в 1 раз, в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз или в 10 раз по сравнению с клетками, замороженными при другой плотности в тех же или сходных условиях. Иллюстративные способы и системы для криогенного хранения и обработки клеток из образца, такого как образец афереза, могут включать способы и системы, описанные в опубликованной международной заявке № WO2018170188. В определенных вариантах осуществления способ и системы включают получение образца афереза перед необходимостью клеточной терапии у пациента, а затем подвергание образца афереза криоконсервации для последующего использования в процессе инженерии клеток, например, Т-клеток, в отношении рекомбинантного рецептора (например, CAR). В определенных случаях такие процессы могут включать процессы, описываемые в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления образец афереза собирают у индивидуума и подвергают криоконсервации с последующим отбором, активацией, стимуляцией, инженерией, трансдукцией, трансфекцией, инкубацией, культивированием, сбором, формулированием популяции Т-клеток клеток и/или введением формулированной популяции клеток индивидууму. В таких примерах подвергнутый криоконсервации образец афереза размораживают до подвергания образца одному или нескольким этапам отбора, таким как любые, из описанных в настоящем документе.

[0539] В определенных вариантах осуществления подвергнутый криоконсервации и/или криопротекции образец клеток (например, образец афереза или лейкоафереза), такой как образец клеток, который не подвергали предшествующему отбору клеток (например,

предшествующему отбору Т-клеток, например, отбора посредством хроматографии) размораживают до его использования в дальнейших процессах получения популяции клеток для клеточной терапии, например, популяции Т-клеток, содержащей CAR⁺ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления такой подвергнутый криоконсервации и/или криопротекции образец клеток (например, образец афереза или лейкофереза) используют в связи с процессом, предоставленным в настоящем документе для терапевтического средства с подвергнутыми инженерии Т-клетками, такого как терапевтическое средство с CAR⁺ Т-клетками. В конкретных примерах дополнительного этапа криоконсервации до или в течение этапов сбора/формулирования не проводят.

1. Характеристики входящей композиции

[0540] В определенных вариантах осуществления входящая композиция содержит Т-клетки, выделенные или отобранные из биологического образца, например, образца афереза, образца лейкофереза. В определенных вариантах осуществления входящую композицию можно подвергать криоконсервации любым из способов, описываемых в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления входящая композиция содержит популяцию, обогащенную CD3⁺ Т-клетками, например, жизнеспособными CD3⁺ Т-клетками. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или точно или приблизительно 100% клеток входящей композиции представляют собой CD3⁺ Т-клетки, например, жизнеспособные CD3⁺ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления входящая композиция в значительной степени состоит из CD3⁺ Т-клеток, например, жизнеспособных CD3⁺ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления входящая композиция обогащена CD4⁺-клетками и/или обогащена CD8⁺-клетками.

[0541] В определенных вариантах осуществления входящая композиция представляет собой обогащенную популяцию клеток, обогащенную CD4⁺ Т-клетками и CD8⁺ Т-клетками, например, CD4⁺ Т-клетками и CD8⁺ Т-клетками. В конкретных вариантах осуществления входящая композиция представляет собой или содержит по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9%, или точно или приблизительно 100% клеток, которые представляют собой CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления входящая композиция в значительной степени состоит из CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

[0542] В определенных вариантах осуществления входящая композиция представляет собой популяцию обогащенных CD4⁺ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере

99,5%, по меньшей мере 99,9% или точно или приблизительно 100% клеток входящей композиции представляют собой $CD4^+$ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления входящая композиция в значительной степени состоит из $CD4^+$ Т-клеток.

[0543] В определенных вариантах осуществления входящая композиция представляет собой популяцию обогащенных $CD8^+$ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или точно или приблизительно 100% клеток входящей композиции представляют собой $CD8^+$ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления входящая композиция в значительной степени состоит из $CD8^+$ Т-клеток.

[0544] В определенных вариантах осуществления клетки из популяции обогащенных $CD4^+$ Т-клеток и клетки из популяции обогащенных $CD8^+$ Т-клеток смешивают, комбинируют и/или объединяют с получением входящей композиции, содержащей $CD4^+$ Т-клетки и $CD8^+$ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления популяции обогащенных $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клетки объединяют, смешивают и/или комбинируют до стимуляции клеток, например, культивирования клеток в стимулирующих условиях так, как описано в разделе II-B. В определенных вариантах осуществления популяции обогащенных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток объединяют, смешивают и/или комбинируют с последующим выделением, обогащением и/или отбором $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток из биологического образца. В конкретных вариантах осуществления популяции обогащенных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток объединяют, смешивают и/или комбинируют с последующей заморозкой, например, криоконсервацией, и разморозкой популяции обогащенных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток.

[0545] В определенных вариантах осуществления входящую композицию получают, смешивая, объединяя и/или комбинируя клетки из популяции обогащенных $CD4^+$ -клеток с клетками из популяции обогащенных $CD8^+$ -клеток. В определенных вариантах осуществления популяция обогащенных $CD4^+$ Т-клеток содержит по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% $CD4^+$ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления популяция обогащенных $CD4^+$ Т-клеток содержит 100% $CD4^+$ Т-клеток или содержит приблизительно 100% $CD4^+$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления популяция обогащенных Т-клеток содержит или содержит менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% $CD8^+$ Т-клеток и/или не содержит $CD8^+$ Т-клеток, и/или не содержит или по существу не содержит $CD8^+$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления популяции клеток в значительной степени состоят из $CD4^+$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления популяция обогащенных $CD8^+$ Т-клеток содержит по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% $CD8^+$ Т-клеток или содержит или содержит приблизительно 100% $CD8^+$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления популяция обогащенных $CD8^+$ Т-клеток содержит или содержит менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1%

или менее 0,01% CD4⁺ Т-клеток, и/или не содержит CD4⁺ Т-клеток, и/или не содержит или по существу не содержит CD4⁺ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления популяции клеток в значительной степени состоят из CD8⁺ Т-клеток.

[0546] В определенных вариантах осуществления CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки объединяют, смешивают и/или комбинируют в отношении от 1:10 до 10:1, от 1:5 до 5:1, от 4:1 до 1:4, 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 приблизительно 1:1 или 1:1 CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления жизнеспособные CD4⁺ Т-клетки и жизнеспособные CD8⁺ Т-клетки объединяют, смешивают и/или комбинируют в отношении от 1:10 до 10:1, от 1:5 до 5:1, от 4:1 до 1:4, 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 приблизительно 1:1 или 1:1 CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток.

[0547] В конкретных вариантах осуществления входящая композиция содержит клетки (например, Т-клетки), которые не позитивны по маркеру апоптоза. В определенных вариантах осуществления маркер апоптоза представляет собой аннексин V и/или активированную каспазу 3. В определенных вариантах осуществления клетки, содержащиеся во входящей композиции, содержат или являются аннексин V⁻, аннексин V⁻/CD3⁺, аннексин V⁻/CD4⁺, аннексин V⁻/CD8⁺, аннексин V⁻/CD3⁺, активированная каспаза 3⁻, активированная каспаза 3⁻/CD3⁺, активированная каспаза 3⁻/CD4⁺, активированная каспаза 3⁻/CD8⁺ или их сочетанием.

[0548] В определенных вариантах осуществления входящая композиция содержит требуемое количество или процент (например, не более 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%) Т-клеток, которые не экспрессируют маркеры апоптоза (например, каспазу-3, аннексин V). В определенных вариантах осуществления входящая композиция содержит требуемое количество или процент Т-клеток, которые продуцируют цитокины после стимуляции. В определенных вариантах осуществления стимуляция не представляет собой антигенспецифичный рекомбинантный рецептор (например, CAR), например, является стимуляцией, включающей РМА/иономицин. В определенных вариантах осуществления продуцируемые цитокины представляют собой или содержат IL-2, TNFα и/или IFNγ. В определенных вариантах осуществления продуцируемые цитокины представляют собой или содержат IL-2 и/или TNFα. В определенных вариантах осуществления способ включает предоставление или получение входящей композиции. В определенных вариантах осуществления входящая композиция содержит требуемый процент CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемый процент CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA. В определенных вариантах осуществления входящая композиция содержит Т-клетки, которые не экспрессируют маркеры апоптоза (например, каспазу-3, аннексин V).

[0549] В определенных аспектах входящую композицию можно получать, получая из полученного у индивидуума биологического образца композицию клеток, содержащую

требуемый процент CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA. В определенных аспектах входящую композицию можно получать, получая из полученного у индивидуума биологического образца композицию клеток, содержащую требуемый процент CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA. В определенных аспектах входящую композицию можно получать после определения количества, количества на единицу объема, количества на единицу массы и/или процентного содержания CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и отбора конкретного количества, объема или массы клеток, которые после смешивания с дополнительными компонентами, содержат требуемый процент CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемый процент CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA. В определенных аспектах входящую композицию можно получать, смешивая композицию клеток, содержащих CD4⁺ Т-клетки, и композицию клеток, содержащих CD8⁺ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления входящую композицию можно получать после определения количества, количества на единицу объема, количества на единицу массы и/или процентного содержания CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27, CD45RA и/или маркеры апоптоза (например, каспазу 3, аннексин V) и/или CD4⁺ Т-клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27, CD45RA и/или маркеры апоптоза (например, каспазу 3, аннексин V), и отбор конкретного количества, объема или массы клеток, которые после смешивания с дополнительными компонентами, содержат требуемый процент CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27, CD45RA и/или маркеры апоптоза (например, каспазу 3, аннексин V) и/или требуемый процент CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27, CD45RA и/или маркеры апоптоза (например, каспазу 3, аннексин V).

[0550] В определенных вариантах осуществления входящую композицию можно получать посредством выделения, очистки, разделения или отбор из получаемого у индивидуума биологического образца требуемого количества CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемого количества CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, таким образом, получая входящую композицию. В определенных вариантах осуществления входящую композицию можно получать посредством выделения, очистки, разделения или отбора из получаемого у индивидуума биологического образца требуемого количества CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27, CD45RA и/или маркеры апоптоза (например, каспазу 3, аннексин V), и/или требуемого количества CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27, CD45RA и/или маркеры апоптоза (например, каспазу 3, аннексин V), таким образом, получая входящую композицию. В определенных аспектах

такое требуемое количество(а) клеток можно комбинировать или смешивать с получением входящей композиции, которая содержит требуемый процент $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемый процент $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA. В определенных аспектах такое требуемое количество(а) клеток можно комбинировать или смешивать с получением входящей композиции, которая содержит требуемый процент $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27, CD45RA и/или маркеры апоптоза (например, каспазу 3, аннексин V) и/или требуемый процент $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27, CD45RA и/или маркеры апоптоза (например, каспазу 3, аннексин V).

[0551] В определенных аспектах входящая композиция содержит требуемый процент $CD4^+/CCR7^-$, $CD4^+/CD27^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD27^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^+$, $CD8^+/CCR7^-$, $CD8^+/CD27^-$, $CD8^+/CCR7^+/CD27^-$, $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ и/или $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^+$ -клеток. В определенных аспектах входящая композиция содержит требуемый процент $CD4^+/CCR7^-$, $CD4^+/CD27^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD27^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^+$, $CD8^+/CCR7^-$, $CD8^+/CD27^-$, $CD8^+/CCR7^+/CD27^-$, $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ и/или $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^+$ - и негативных по маркеру апоптоза (например, аннексин V⁻ или каспаза 3⁻) клеток.

[0552] В определенных вариантах осуществления входящая композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки и $CD8^+$ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления входящая композиция содержит один или несколько подтипов или популяций $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления один или несколько подтипов или популяций включают клетки, которые экспрессируют, например, экспрессируют на поверхности клетки или не экспрессируют один или несколько маркеров, ассоциированных с определенными фенотипами клеток, включая маркеры, ассоциированные или указывающие на менее дифференцированный фенотип клеток, и/или маркеры, ассоциированные или указывающие на подтип клеток памяти. В конкретных вариантах осуществления входящая композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, и по меньшей мере часть $CD4^+$ Т-клеток экспрессируют маркеры, ассоциированные с менее дифференцированным фенотипом, такие как CCR7 и/или CD27. В определенных вариантах осуществления входящая композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, и по меньшей мере часть $CD8^+$ Т-клеток экспрессирует маркеры, ассоциированные с менее дифференцированным фенотипом, такие как CCR7 и/или CD27. В конкретных вариантах осуществления входящая композиция содержит и/или содержит фиксированные, предпочтительные, заданные, определенные и/или контролируемые процент или отношение клеток, демонстрирующих конкретный фенотип, например, требуемый процент $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемый процент $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA.

[0553] В определенных вариантах осуществления способы включают один или несколько этапов смешивания или комбинации клеток или композиций клеток для получения или производства входящей композиции. В определенных вариантах осуществления клетки или композиции клеток отбирают и/или выделяют из образца. В определенных вариантах осуществления клетки входящей композиции отбирают и/или выделяют из образца. В определенных вариантах осуществления $CD4^+$ Т-клетки и/или композицию $CD4^+$ Т-клеток отбирают или выделяют из образца. В определенных вариантах осуществления $CD8^+$ Т-клетки и/или композиция $CD8^+$ Т-клеток отбирают или выделяют из образца. В определенных вариантах осуществления образец представляет собой биологический образец, такой как образец крови, образец афереза и/или образец лейкофереза. В определенных вариантах осуществления образец получают у индивидуума, например, человека. В конкретных вариантах осуществления композицию $CD4^+$ Т-клеток и композицию $CD8^+$ Т-клеток выделяют и/или отбирают из одного и того же образца. В определенных вариантах осуществления композицию $CD4^+$ Т-клеток и композицию $CD8^+$ Т-клеток выделяют и/или отбирают из образцов, взятых или полученных у одного и того же индивидуума.

[0554] В определенных вариантах осуществления получение или продукция входящей композиции включает один или несколько этапов оценивания, характеристики и/или идентификации клеток. В конкретных вариантах осуществления клетки оценивают, характеризуют и/или идентифицируют в композиции $CD4^+$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления клетки оценивают, характеризуют и/или идентифицируют в композиции $CD8^+$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления клетки позитивны по маркеру, который указывает и/или ассоциирован с менее дифференцированным фенотипом клеток или состоянием, и/или маркерам, ассоциированным или указывающим на подтип клеток памяти. В определенных вариантах осуществления клетки негативны по маркеру, который указывает и/или ассоциирован с более дифференцированным состоянием Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления клетки из композиций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток оценивают, характеризуют и/или идентифицируют для определения количества, уровня, части и/или процентного содержания клеток, которые представляют собой, позитивны по одному или нескольким маркерам, ассоциированным с менее дифференцированным фенотипом клеток или состоянием, и/или маркерам, ассоциированным или указывающим на подтип клеток памяти, и/или негативны по одному или нескольким маркерам, ассоциированным с более дифференцированным состоянием. В определенных вариантах осуществления клетки композиции $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток оценивают, характеризуют и/или идентифицируют для определения количества, уровня, части и/или процентного содержания клеток, которые демонстрируют конкретные фенотипы, например, экспрессию или дефицит экспрессии маркеров, ассоциированных с менее дифференцированным фенотипом клеток или состоянием, и/или маркеров, ассоциированных или указывающих на подтип клеток памяти.

[0555] В определенных вариантах осуществления способы включают один или несколько этапов смешивания или комбинирования композиции клеток, содержащей $CD4^+$ Т-клетки, с композицией клеток, содержащей $CD8^+$ Т-клетки, с получением или производством композиции клеток, например, входящей композиции с требуемым процентным содержанием Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или с требуемым процентным содержанием $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA. В определенных вариантах осуществления получение или продукция входящей композиции включает один или несколько этапов: (i) выделения или отбора композиции $CD4^+$ Т-клеток и/или композиции $CD8^+$ Т-клеток из образца, например, биологического образца; (ii) оценки, характеристики и/или идентификации количества, уровня, части и/или процентного содержания клеток, которые являются позитивными или негативными по одному или нескольким маркерам, ассоциированным с менее дифференцированным фенотипом клеток или состоянием, и/или маркерам, ассоциированным или указывающим на подтип клеток памяти или более дифференцированный подтип, например, CCR7, CD27 и/или CD45RA, в композиции $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток; и/или (iii) смешивания или комбинирования клеток композиции $CD4^+$ Т-клетки с клетками композиции $CD8^+$ Т-клеток с заданным, определенным, фиксированным и/или предпочтительным процентным содержанием Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или процентным содержанием $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, во входящей композиции в отношении, которое отлично от отношения, которое существует в образце.

[0556] В определенных аспектах требуемый процент $CD4^+/CCR7^-$, $CD4^+/CD27^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD27^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^+$, $CD8^+/CCR7^-$, $CD8^+/CD27^-$, $CD8^+/CCR7^+/CD27^-$, $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ и/или $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^+$ -клеток во входящей композиции, включают, по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех клеток во входящей композиции, или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех клеток во входящей композиции, являющихся $CD4^+/CCR7^-$, $CD4^+/CD27^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD27^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^+$, $CD8^+/CCR7^-$, $CD8^+/CD27^-$, $CD8^+/CCR7^+/CD27^-$, $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ и/или $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^+$ -клетками.

[0557] В определенных вариантах осуществления требуемый процент $CCR7^-$, $CD27^-$ и/или $CCR7^+/CD27^-$ -клеток во входящей композиции составляет по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех клеток во входящей композиции, или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех клеток во входящей композиции, являющихся $CCR7^-$, $CD27^-$ и/или $CCR7^+/CD27^-$ -клетками.

[0558] В определенных вариантах осуществления способы включают один или несколько этапов генетической инженерии клеток входящей композиции. В определенных

вариантах осуществления генетическая инженерия включает один или несколько этапов инкубации клеток входящей композиции в условиях, активирующих и/или стимулирующих клетки, доставки одного или нескольких средств, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, например, рекомбинантную и/или гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты, в клетки, наращивания клеток посредством инкубации клеток в активирующих и/или стимулирующих условиях, сбора клеток и/или хранения клеток в условиях заморозки, например, криоконсервации. В определенных вариантах осуществления один или несколько этапов генетической инженерии позволяют получать выходящую композицию клеток, содержащую подвергнутые инженерии клетки. В определенных вариантах осуществления подвергнутые инженерии клетки выходящей композиции находятся в фиксированном, определенном и/или заданном отношении экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или в определенном отношении рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

В. Активация и стимуляция клеток

[0559] В определенных вариантах осуществления один или несколько этапов обработки включают этап стимуляции выделенных клеток, таких как популяции отобранных клеток. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют и/или культивируют до проведения генетической инженерии или для нее. Инкубация может предшествовать или быть связана с генетической инженерией, такой как генетическая инженерия, являющаяся результатом вариантов осуществления способа трансдукции, описанных выше. В определенных вариантах осуществления стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток, например, перед трансдукцией. Этапы инкубации могут включать культивирование, стимуляцию, активацию и/или выращивание. Инкубацию и/или инженерию можно проводить в емкости для культивирования, такой как ячейка, камера, лунка, колонка, пробирка, система трубок, клапан, флакон, чашка для культивирования, пакет или другой контейнер для культивирования клеток. В определенных вариантах осуществления композиции или клетки инкубируют в стимулирующих условиях или со стимулирующим средством. Такие условия включают условия, предназначенные для индукции пролиферации, роста, активации и/или жизнеспособности клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для примирования клеток для генетической инженерии, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора.

[0560] В определенных вариантах осуществления этапы обработки включают инкубации клеток, например, отобранных клеток, где эти этапы инкубации могут включать культивирование, стимуляцию, активацию и/или выращивание клеток. В

определенных вариантах осуществления композиции или клетки инкубируют в стимулирующих условиях или со стимулирующим средством. Такие условия включают условия, предназначенные для индукции пролиферации, активации и/или жизнеспособности клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для примирования клеток для генетической инженерии, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора.

[0561] В определенных вариантах осуществления условия стимуляции и/или активации могут включать одно или несколько из конкретных сред, температур, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, средств, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотик, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие средства, предназначенные для активации клеток.

[0562] В определенных вариантах осуществления стимулирующие условия или средства включают одно или несколько средств, например, лиганд, способный к стимуляции или активации домен внутриклеточной сигнализации комплекса TCR. В определенных аспектах средство запускает или инициирует каскад внутриклеточной передачи сигнала TCR/CD3 в Т-клетке. Такие средства могут включать средства, подходящие для доставки первичного сигнала, например, для инициации активации индуцированного ИТАМ сигнала, такие как антитела, такие как антитела, специфичные к TCR, например, антитела к CD3. В определенных вариантах осуществления стимулирующие условия включают одно или несколько средств, например, лиганд, способный к стимуляции костимулирующего рецептора, например, антитела к CD28 или антитела к 4-1BB. В определенных вариантах осуществления такие средства и/или лиганды могут быть связаны с твердой подложкой, такой как гранула, и/или с одним или несколькими цитокинами. Стимулирующие средства включают гранулы со связывающим CD3 средством/связывающим CD28 средством (например, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander и/или гранулы ExpACT®). Необязательно, способ наращивания может дополнительно включать этап добавления к среде для культивирования антитела к CD3 и/или антитела к CD28 (например, в концентрации по меньшей мере приблизительно 0,5 нг/мл). В определенных вариантах осуществления стимулирующие средства включают IL-2, IL-7 и/или IL-15, например, IL-2 в концентрации по меньшей мере приблизительно 10 единиц/мл, по меньшей мере приблизительно 50 единиц/мл, по меньшей мере приблизительно 100 единиц/мл или по меньшей мере приблизительно 200 единиц/мл.

[0563] В определенных вариантах осуществления одно или несколько стимулирующих средств способно к активации Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток и/или CD8⁺ Т-клеток; способно к индукции сигнала через комплекс TCR и/или способно к индукции пролиферации Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток и/или CD8⁺ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления одно или несколько стимулирующих средств содержит первичное

средство, которое связывается с участником комплекса TCR, необязательно, которое специфически связывается с CD3. В определенных вариантах осуществления одно или несколько стимулирующих средств дополнительно содержат вторичное средство, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой Т-клетки. В определенных вариантах осуществления костимулирующая молекула выбрана из группы, состоящей из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. В определенных вариантах осуществления первичное и вторичное средства содержат антитела, необязательно, где одно или несколько стимулирующих средств включают инкубацию с антителом к CD3 и антителом к CD28. В определенных вариантах осуществления одно или несколько стимулирующих средств находятся на поверхности твердой подложки, необязательно гранулы. В определенных вариантах осуществления одно или несколько стимулирующих средств выбраны из группы, состоящей из связывающих CD3 молекул; связывающих CD28 молекул; рекомбинантного IL-2; рекомбинантного IL-15 и рекомбинантного IL-7, вакцины, содержащей антиген, специфически распознаваемый антигенным рецептором, и антиидиотипического антитела, которое специфически связывается с антигенным рецептором или их сочетаний.

[0564] Условия могут включать одно или несколько из конкретной среды, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, средств, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие средства, предназначенные для активации клеток.

[0565] В вариантах осуществления антиген-специфичные Т-клетки, такие как антиген-специфичные CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки, получают посредством стимуляции наивных или антиген-специфичных Т-лимфоцитов антигеном. Например, можно получать линии или клоны антиген-специфичных Т-клеток к антигенам цитомегаловируса посредством выделения Т-клеток у инфицированных индивидуумов и стимуляции клеток *in vitro* те же антигеном.

[0566] В определенных аспектах инкубацию проводят способами, такими как способы, описанные в патент США № 6040177, выданном Riddell et al., Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood. 117:72-82 и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

[0567] В определенных вариантах осуществления стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста Т-лимфоцитов человека, например, по меньшей мере приблизительно 25 градусов Цельсия, как правило, по меньшей мере приблизительно 30 градусов, и как правило точно или приблизительно 37 градусов Цельсия. Необязательно, инкубация дополнительно может включать добавление неделящихся трансформированных EBV лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве фидерных клеток. LCL можно облучать гамма-лучами в диапазоне приблизительно от 6000 до 10000 рад. Фидерные клетки LCL в определенных аспектах предоставлены в

любом подходящем количестве, таком как отношение фидерных клеток LCL и исходных Т-лимфоцитов по меньшей мере приблизительно 10:1.

[0568] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации с одним или несколькими стимулирующими условиями или стимулирующими средствами проводят во внутренней полости камеры центрифуги, например, в условиях центрифугирования так, как описано в международной публикации № WO2016/073602. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации, проводимой в камере центрифуги, включает смешивание с реагентом или реагентами с индукцией стимуляции и/или активации. В определенных вариантах осуществления клетки, например, отобранные клетки, смешивают в стимулирующих условиях или со стимулирующим средством в камере центрифуги. В определенных аспектах таких процессов определенный объем клеток смешивают с определенным количеством одного или нескольких стимулирующих условий или средств, составляющих намного меньшее количество, чем в норме используют при проведении сходных стимуляций в планшете для культур клеток или другой системе.

[0569] В определенных вариантах осуществления стимулирующее средство добавляют в клетки в пространстве камеры в количестве, которое является значительно меньшим (например, составляет не более 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% количества) по сравнению с количеством стимулирующего средства, которое, как правило, используют или которое необходимо для достижения приблизительно такой же или сходной эффективности отбора такого же количества клеток или такого же объема клеток при проведении отбора без смешивания в камере центрифуги, например, в пробирке или пакете с периодическим встряхиванием или переворачиванием. В определенных вариантах осуществления инкубацию проводят с добавлением к клеткам буфера для инкубации и стимулирующего средства для достижения заданного объема с инкубацией реагента, например, приблизительно от 10 мл до приблизительно 200 мл, или приблизительно от 20 мл до приблизительно 125 мл, так как по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или приблизительно 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 105 мл, 110 мл, 115 мл, 120 мл, 125 мл, 130 мл, 135 мл, 140 мл, 145 мл, 150 мл, 160 мл, 170 мл, 180 мл, 190 мл или 200 мл. В определенных вариантах осуществления буфер для инкубации и стимулирующее средство перед добавлением к клеткам предварительно смешивают. В определенных вариантах осуществления буфер для инкубации и стимулирующее средство добавляют к клеткам отдельно. В определенных вариантах осуществления стимуляция инкубацию проводят в условиях периодического осторожного перемешивания, что может способствовать стимуляции энергетически предпочтительных взаимодействия и, таким образом, обеспечить для достижения стимуляции и активации клеток применение меньшего общего количества стимулирующего средства.

[0570] В определенных вариантах осуществления инкубацию, как правило, проводят в условиях смешивания, например, при центрифугировании, как правило при

относительно небольших ускорении или скорости, например, скорости, меньшей чем скорость, которую используют для осаждения клеток, такой как от 600 об./мин. до 1700 об./мин. или приблизительно от 600 об./мин. до приблизительно 1700 об./мин. (например, точно или приблизительно или по меньшей мере 600 об./мин., 1000 об./мин., или 1500 об./мин., или 1700 об./мин.), например, при RCF образца или стенок камеры или другого контейнера от 80 g до 100 g или приблизительно от 80 g до приблизительно 100 g (например, точно или приблизительно или по меньшей мере 80 g, 85 g, 90 g, 95 g, или 100 g). В определенных вариантах осуществления центрифугирование проводят с повторными интервалами центрифугирования при такой низкой скорости с последующим периодом покоя, например, центрифугирование и/или покой в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, центрифугирование приблизительно в течение 1 или 2 секунд с последующим покоем в течение приблизительно 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0571] В определенных вариантах осуществления общая длительность инкубации, например, стимулирующим средством, составляет от или приблизительно 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 18 часов до 30 часов или от 12 часов до 24 часов, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или приблизительно 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов или 72 часа. В определенных вариантах осуществления дополнительная инкубация составляет период от или приблизительно 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.

С. Генетическая инженерия

[0572] В определенных вариантах осуществления этапы обработки включают введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок. В определенных вариантах осуществления клетки, например, Т-клетки, подвергают генетической инженерии с экспрессией рекомбинантного рецептора. В число таких рекомбинантных белков входят рекомбинантные рецепторы, такие как любой из описанных в разделе III. В определенных вариантах осуществления инженерии проводят посредством введения полинуклеотидов, которые кодируют рекомбинантный рецептор. Также предоставлены полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантный рецептор, и векторы или конструкции, содержащий такие нуклеиновые кислоты и/или полинуклеотиды. Введение в клетку молекул нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, можно проводить с использованием любого из ряда известных векторов. Такие векторы включают вирусные и невирусные системы, включая лентивирусные и гаммаретровирусные системы, а также основанные на транспозонах системы, такие как системы переноса генов на основе PiggyBac или Sleeping Beauty. Иллюстративные способы включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, включающих вирусную, например, ретровирусную или лентивирусную, трансдукцию, транспозоны и электропорацию.

[0573] В определенных вариантах осуществления получение подвергнутых инженерии клеток включает один или несколько этапов культивирования и/или

подготовки. Клетки для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансгенный рецептор, такой как CAR, можно выделять из образца, такого как биологический образец, например, образец, получаемый у индивидуума. В определенных вариантах осуществления индивидуум, у которого получают клетки, представляет собой индивидуума с заболеванием или патологическим состоянием или с необходимостью клеточной терапии или индивидуума, которому вводят клеточное терапевтическое средство. Индивидуум в определенных вариантах осуществления представляет собой человека с необходимостью конкретной терапевтической интервенции, такой как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, обрабатывают и/или подвергают инженерии.

[0574] В определенных вариантах осуществления композиции клеток подвергают инженерии, например, трансдукции или трансфекции, с последующим культивированием клеток, например, в условиях, которые стимулируют пролиферацию и/или рост. В конкретных вариантах осуществления композиции клеток подвергают инженерии после стимуляции, активации и/или инкубации композиций в стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления композиции представляют собой стимулированные композиции. В конкретных вариантах осуществления стимулированные композиции предварительно были подвергнуты криоконсервации и хранению, и до проведения инженерии их размораживают.

[0575] В определенных вариантах осуществления перенос генов проводят посредством первичной стимуляции клеток, например, посредством их комбинации со стимулом, который индуцирует ответ, такой как пролиферация, жизнеспособность и/или активация, например, как определяют по экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукции активированных клеток и выращиванием их в культуре до количеств, достаточных для клинического применения.

[0576] В определенных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, получаемые из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированных вирусов (AAV) и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

[0577] В определенных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством электропорации (см., например, Chicaibam et al, (2013) PLoS One 8(3): e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). В определенных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством транспозиции (см., например, Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; и Huang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126). Другие способы введения и экспрессии генетического материала в иммунных клетках включают трансфекцию с фосфатом кальция (например, как описано в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.), слияние протопластов, опосредуемая катионными липосомами

трансфекция; облегчаемая вольфрамовыми частицами бомбардировка микрочастицами (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); и соосложение ДНК с фосфатом стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)).

[0578] Другие подходы и векторы для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, включают способы, описанные, например, в публикации международной патентной заявки № WO2014055668 и в патенте США № 7446190.

[0579] В определенных вариантах осуществления клетки, например, Т-клетки, можно трансфицировать в течение или после наращивания, например, Т-клеточным рецептором (TCR) или химерным антигенным рецептором (CAR). Эту трансфекцию для введения гена требуемого рецептора можно проводить, например, любым подходящим ретровирусным вектором. Из генетически модифицированной популяции клеток затем можно удалять исходный стимул (например, стимул CD3/CD28) и затем стимулировать стимулом второго типа, например, посредством введенного *de novo* рецептора). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме молекулы пептид/МНС, распознаваемого (перекрестного) лиганда генетически введенного рецептора (например, природного лиганда CAR) или любого лиганда (такого как антитело), которые непосредственно связывается с областью в пределах каркаса нового рецептора (например, распознавая константные области в пределах 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).

[0580] В определенных случаях можно использовать вектор, который не требует активации клеток, например, Т-клеток. В некоторых таких случаях, клетки можно выбирать и/или трансдуцировать до активации. Таким образом, клетки можно подвергать инженерии до или с последующим культивированием клеток, и в определенных случаях одновременно или в течение по меньшей мере части культивирования.

[0581] В определенных аспектах клетки дополнительно подвергают инженерии для стимуляции экспрессии цитокинов или других факторов. В число дополнительных нуклеиновых кислот, например, генов для введения, входят гены для увеличения эффективности терапии, например, вследствие обеспечения жизнеспособности и/или функции подвергнутых переносу клеток; гены, обеспечивающие генетические маркеры для отбора и/или оценки клеток, например, для оценки жизнеспособности или локализации *in vivo*; гены для улучшения безопасности, например, делая клетки чувствительными к отрицательному 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); также см. публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 Lupton et al., где описано применение бифункциональных селективируемых слитых генов, получаемых на основе слияния доминантным маркером положительным селекцией с маркером отрицательной селекцией. См., например, Riddell et al., патент США № 6040177, в колонках 14-17.

[0582] В определенных вариантах осуществления введение проводят посредством контакта одной или нескольких клетки композиции с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В определенных вариантах осуществления контакт можно проводить с использованием центрифугирования, такого как центрифужная инокуляция (например, центрифужная инокуляция). Такие способы включают любой из способов, как описано в международной публикации № WO2016/073602. Иллюстративные центрифужные камеры включают камеры, производимые и продаваемые Biosafe SA, включая камеры для применения в системах Sерах® и Sерах® 2, включая центрифужные камеры A-200/F и A-200 и различные наборы для применения в таких системах. Иллюстративные камеры, системы и инструментарий и помещения для обработки описаны, например, в патенте США № 6123655, патенте США № 6733433 и в опубликованной патентной заявке США № US 2008/0171951, и опубликованной международной патентной заявке № WO 00/38762, содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ в качестве ссылки. Иллюстративные наборы для применения в таких системах в качестве неограничивающих примеров включают одноразовые наборы, предоставляемые BioSafe SA под торговыми наименованиями CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 или CS-900.2.

[0583] В определенных вариантах осуществления система входит в состав и/или связана с другим инструментарием, включая инструментарий выполнения, автоматизации, контроля и/или мониторинга различных аспектов этапа трансдукции и одного или нескольких других различных этапов обработки, проводимых в системе, например, один или несколько этапов обработки, которые можно проводить в системе центрифужных камер или в ассоциации с ней, как описано в настоящем документе или в международной публикации № WO2016/073602. Этот инструментарий в определенных вариантах осуществления содержится в помещении. В определенных вариантах осуществления инструментарий включает помещение, которое содержит отсек, содержащий контрольные схемы, центрифугу, крышку, моторы, насосы, датчики, дисплеи и пользовательский интерфейс. Иллюстративное устройство описано в патенте США № 6123655, патенте США № 6733433 и US 2008/0171951.

[0584] В определенных вариантах осуществления система содержит ряд контейнеров, например, пакетов, систему трубок, клапаны, зажимы, коннекторы и камеру центрифуги. В определенных вариантах осуществления контейнеры, такие как пакеты, включают один или несколько контейнеров, таких как пакеты, содержащие клетки для трансдукции и частицы вирусного вектора в одном и том же контейнере или в отдельных контейнерах, например, в одном и том же пакете или в отдельных пакетах. В определенных вариантах осуществления система дополнительно включает один или несколько контейнеров, таких как пакеты, содержащие среду, такую как разбавитель и/или отмывочный раствор, которые добавляют в камеру и/или другие компоненты для разбавления, ресуспендирования и/или отмывки компонентов и/или композиций при проведении способов. Контейнеры можно соединять в одном или нескольких положениях

в системе, например, в положении, соответствующем входной линии, линии разбавителя, отмывочной линии, спускной линии и/или выходной линии.

[0585] В определенных вариантах осуществления камера связана с центрифугой, которая способна производить вращение камеры, например, вокруг ее оси вращения. Вращение может происходить до, во время и/или после инкубации для трансдукции клеток и/или на одном или нескольких других этапах обработки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления один или несколько различных этапов обработки проводят при вращении, например, с определенным ускорением. Камера обычно способна к вертикальному или, как правило, вертикальному вращению, так что камера во время центрифугирования расположена вертикально, и боковая стенка и ось являются вертикальными или, как правило, вертикальными, а торцевая стенка(и) расположены горизонтально или, как правило, горизонтально.

[0586] В определенных вариантах осуществления композицию, содержащую клетки, вирусные частицы и реагент, можно центрифугировать, как правило при относительно небольших ускорении или скорости, например, скорости, меньшей чем скорость, которую используют для осаждения клеток, такой как от 600 об./мин. до 1700 об./мин. или приблизительно от 600 об./мин. до приблизительно 1700 об./мин. (например, точно или приблизительно или по меньшей мере 600 об./мин., 1000 об./мин., или 1500 об./мин. или 1700 об./мин.). В определенных вариантах осуществления центрифугирование проводят при ускорении, например, относительном центробежном ускорении, от 100 g до 3200 g или приблизительно от 100 g до приблизительно 3200 g (например, точно или приблизительно или по меньшей мере или приблизительно 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g или 3200 g), как определяют, например, на внутренней или внешней стенке камеры или полости. Термин "относительное центробежное ускорение" или RCF, как правило, понимают как эффективное ускорение, придаваемое объекту или веществу (такому как клетка, образец или осадок и/или точка в камере или другом контейнере, подвергнутом вращению), относительно ускорения свободного падения Земли, в конкретной точке пространства по сравнению с осью вращения. Значение можно определять с использованием хорошо известных формул, учитывая силу гравитации, скорость вращения и радиус вращения (расстояние от оси вращения до объекта, вещества или частицы, где измеряют RCF).

[0587] В определенных вариантах осуществления в течение по меньшей мере части процедуры генетической инженерии, например, трансдукции, и/или после генетической инженерии клетки переносят в контейнер, такой как пакет, например, набор пакетов биореактора, для культивирования подвергнутых генетической инженерии клеток, например, для культивирования или наращивания клеток, как описано выше. В определенных вариантах осуществления контейнер для культивирования или наращивания клеток представляет собой пакет для биореактора, такой как пакет для перфузии.

1. Векторы и способы

[0588] В определенных вариантах осуществления этапы обработки включают введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, в клетку, и его можно проводить с использованием любого из ряда известных векторов. В определенных вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор или невирусный вектор. В определенных случаях вектор представляет собой вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор, например, лентивирусный вектор или гаммаретровирусный вектор.

[0589] В определенных случаях последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, например, химерный антигенный рецептор (CAR), содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Неограничивающие иллюстративные примеры сигнальных пептидов включают, например, сигнальный пептид альфа-цепи GMCSFR, сигнальный пептид CD8 альфа или сигнальный пептид CD33.

[0590] В определенных вариантах осуществления векторы включают вирусные векторы, например, ретровирусные или лентивирусные, невирусные векторы или транспозоны, например, систему транспозонов Sleeping Beauty, векторы, получаемые из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусы, аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирусные векторы или ретровирусные векторы, такие как гамма-ретровирусные векторы, ретровирусный вектор, получаемый из вируса лейкоза мышей молони (MoMLV), вирус миелопролиферативной саркомы (MPSV), вирус эмбриональных стволовых клеток мыши (MESV), вирус стволовых клеток мыши (MSCV), вирус формирования узлов в селезенке (SFFV) или аденоассоциированный вирус (AAV).

[0591] В определенных вариантах осуществления вирусный вектор или невирусный ДНК содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный рекомбинантный белок. В определенных вариантах осуществления гетерологичная рекомбинантная молекула представляет собой или содержит рекомбинантный рецептор, например, антигенный рецептор, SB-транспозоны, например, для сайленсинга генов, находящиеся в капсиде транспозоны, гомологичную двухцепочечную нуклеиновую кислоту, например, для геномной рекомбинации или репортерные гены (например, флуоресцентных белков, таких как GFP, или люциферазы).

2. Получение частицы вирусного вектора для трансдукции

[0592] В определенных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, получаемые из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусы, аденоассоциированный вирус (AAV). В определенных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гаммаретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46;

Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 November 29(11): 550-557.

[0593] В определенных вариантах осуществления ретровирусный вектор содержит последовательность длинного концевой повтора (LTR), например, ретровирусный вектор, получаемый из вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вирус миелопролиферативной саркомы (MPSV), вирус эмбриональных стволовых клеток мыши (MESV), вирус стволовых клеток мыши (MSCV) или формирующий узлы в селезенке вирус (SFFV). В определенных вариантах осуществления ретровирусы включают вирусы, получаемые из любого источника клеток птиц или млекопитающих. Как правило, ретровирусы являются амфотропными, что означает, что они способны инфицировать клетки-хозяева различных видов, включая людей. В одном из вариантов осуществления экспрессируемый ген заменяет ретровирусные последовательности *gag*, *pol* и/или *env*. Описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (например, патенты США №№ 5219740; 6207453; 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.

[0594] Способы лентивирусной трансдукции известны. Иллюстративные способы описаны, например, в Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) *Blood*. 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) *Methods Mol. Biol.* 506: 97-114; и Cavalieri et al. (2003) *Blood*. 102(2): 497-505.

[0595] В определенных вариантах осуществления частицы вирусного вектора содержат геном, получаемый из вектора на основе ретровирусного генома, например, получаемый из вектор на основе лентивирусного генома. В определенных аспектах предоставляемых вирусных векторов гетерологичная нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, такой как CAR, содержится и/или расположена между 5' LTR и 3' LTR последовательностями генома вектора.

[0596] В определенных вариантах осуществления геном вирусного вектора представляет собой геном лентивируса, такого как геном ВИЧ-1 или геном SIV. Например, лентивирусные векторы получены посредством множественной аттенуации генов вирулентности, например, можно удалять гены *env*, *vif*, *vpr* и *nef*, делая вектор более безопасным для терапевтических целей. Лентивирусные векторы известны. См. Naldini et al., (1996 и 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США №№ 6013516 и 5994136). В определенных вариантах осуществления эти вирусные векторы представляют собой основанные на плаزمиде или основанные на вирусах векторы и сконструированы для несения существенных последовательностей для введения чужеродной нуклеиновой кислоты, для отбора и для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Известные лентивирусы можно легко получить из депозитариев или коллекций, таких как American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd.,

Manassas, Va. 20110-2209), или выделять из известных источников с общедоступными способами.

[0597] Неограничивающие примеры лентивирусных векторов включают векторы, получаемые из лентивирусов, таких как вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), ВИЧ-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), Т-лимфотропный вирус человека 1 (HTLV-1), HTLV-2 или вирус инфекционной анемии лошадей (E1AV). Например, лентивирусные векторы получают посредством множественной аттенуации генов вирулентности ВИЧ, например, удалены гены *env*, *vif*, *vpr*, *vri* и *nef*, что делает вектор более безопасным для терапевтических целей. Лентивирусные векторы известны в данной области, см. Naldini et al., (1996 и 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США №№ 6013516 и 5994136). В определенных вариантах осуществления эти вирусные векторы представляют собой векторы на основе плазмид или векторы на основе вирусов, и сконструированы для несения существенных последовательностей для введения чужеродной нуклеиновой кислоты, для отбора и для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Известные лентивирусы можно легко получать из депозитариев или коллекций, таких как the American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), или выделять из известных источников общедоступными способами.

[0598] Как правило, геном вирусного вектора сконструирован в форме плазмиды, которую можно трансфицировать в паковую или продуцирующую линию клеток. В любом из таких примеров, нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, встраивают или помещают в область вирусного вектора, например, как правило, в несущественную область вирусного генома. В определенных вариантах осуществления нуклеиновую кислоту встраивают в вирусный геном в положении определенных вирусных последовательностей с получением вируса, дефектного по репликации.

[0599] Для получения ретровирусных частиц, геном которых содержит копию РНК генома вирусного вектора можно использовать любой из множества известных способов. В определенных вариантах осуществления в получение системы доставки генов на основе вируса вовлечены по меньшей мере два компонента: первый, паковые плазмиды, кодирующие структурные белки, а также ферменты, необходимые для получения частиц вирусного вектора, и второй, сам вирусный вектор, т.е., генетический материал для трансфекции. В конструкцию одного или обоих этих компонентов можно вводить средства обеспечения биобезопасности.

[0600] В определенных вариантах осуществления паковая плазида может кодировать все ретровирусные, например, ВИЧ-1, белки, отличные от белков оболочки (Naldini et al., 1998). В других вариантах осуществления у вирусных векторов могут отсутствовать дополнительные вирусные гены, такие как гены, которые ассоциированы с вирулентностью, например, *vpr*, *vif*, *vri* и *nef* и/или Tat, первичного транскриптора ВИЧ. В определенных вариантах осуществления лентивирусные векторы, такие как лентивирусные векторы на основе ВИЧ, содержат только три гена родительского вирус:

gag, pol и rev, что уменьшает или устраняет возможность восстановления вируса дикого типа посредством рекомбинации.

[0601] В определенных вариантах осуществления геном вирусного вектора вводят в паковую линию клеток, которая содержит все компоненты, необходимые для упаковки вирусной геномной РНК, транскрибируемой с геномом вирусного вектора, в вирусные частицы. Альтернативно, геном вирусного вектора в дополнение к одной или нескольким последовательностям, например, представляющим интерес рекомбинантным нуклеиновым кислотам, может содержать один или несколько генов, кодирующих компоненты вируса. Однако, в определенных аспектах, для предотвращения репликации генома в клетке-мишени, эндогенные вирусные гены, необходимые для репликации, удалены и предоставлены отдельно в паковой линии клеток.

[0602] В определенных вариантах осуществления паковую линию клеток трансфицируют одним или несколькими плазмидными векторами, содержащими компоненты, необходимые для получения частиц. В определенных вариантах осуществления паковую линию клеток трансфицируют плазмидой, содержащей геном вирусного вектора, содержащий LTR, цис-действующую паковую последовательность и последовательность, представляющую интерес, т.е. нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный рецептор, такой как CAR; и одной или несколькими хелперными плазмидами, кодирующими ферментативные и/или структурные компоненты вируса, такие как Gag, pol и/или rev. В определенных вариантах осуществления несколько векторов используют для разделения различных генетических компонентов, которые формируют частицы ретровирусного вектора. В некоторых таких вариантах осуществления, предоставление отдельных векторов для упаковывающей клетки снижает вероятность событий рекомбинации, которые в иных случаях могли бы приводить к формированию компетентных по репликации вирусов. В определенных вариантах осуществления можно использовать один плазмидный вектор, содержащий все компоненты ретровируса.

[0603] В определенных вариантах осуществления частицу ретровирусного вектора, такую как частица лентивирусного вектора, подвергают псевдотипированию для увеличения эффективности трансдукции клеток-хозяев. Например, в определенных вариантах осуществления, частицу ретровирусного вектора, такую как частица лентивирусного вектора, подвергают псевдотипированию с использованием гликопротеина VSV-G, который обеспечивает широкий диапазон клеток-хозяев, увеличивая число типов клеток, которые можно подвергать трансдукции. В определенных вариантах осуществления паковую линию клеток трансфицируют плазмидой или полинуклеотидом, кодирующим ненативный гликопротеин оболочки, например, для включения ксенотропных, политропных или амфотропных оболочек, таких как оболочка вируса Sindbis, GALV или VSV-G.

[0604] В определенных вариантах осуществления паковая линия клеток обеспечивает компоненты, включая вирусные регуляторные и структурные белки, которые необходимы в транс-положении для упаковки вирусной геномной РНК в частицы

лентивирусного вектора. В определенных вариантах осуществления пакующая линия клеток может представлять собой любую линию клеток, которая способна к экспрессии лентивирусных белков и продукции функциональных частиц лентивирусного вектора. В определенных аспектах подходящие пакующие линии клеток включают клетки 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLA (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) и Cf2Th (ATCC CRL 1430).

[0605] В определенных вариантах осуществления пакующая линия клеток стабильно экспрессирует вирусный белок(ки). Например, в определенных аспектах можно конструировать пакующую линию клеток, содержащую gag, pol, rev и/или другие структурные гены, но не содержащую LTR и пакующие компоненты. В определенных вариантах осуществления пакующую линию клеток вместе с геномом вирусного вектора, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок, и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей гликопротеин оболочки можно транзитивно трансфицировать молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими один или несколько вирусных белков.

[0606] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы и пакующие и/или хелперные плазмиды посредством трансфекции или инфекции вводят в пакующую линию клеток. Пакующая линия клеток продуцирует частицы вирусного вектора, которые содержат геном вирусного вектора. Способы трансфекции или инфекции хорошо известны. Неограничивающие примеры включают способы с фосфатом кальция, с DEAE-декстраном и липофекцию, электропорацию и микроинъекцию.

[0607] Когда рекомбинантную плазмиду и ретровирусные LTR и пакующие последовательности вводят в специальную клеточную линию (например, посредством осаждения с фосфатом кальция), пакующие последовательности могут обеспечивать упаковку РНК-транскрипта рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем могут секретироваться в среды для культивирования. В определенных вариантах осуществления среду, содержащую рекомбинантные ретровирусы, затем собирают, необязательно концентрируют и используют для переноса генов. Например, в определенных аспектах после совместной трансфекции пакующих плазмид и вектора для переноса в пакующую линию клеток, частицы вирусного вектора восстанавливают из среды для культивирования и титруют стандартными способами, используемыми специалистами в данной области.

[0608] В определенных вариантах осуществления ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, можно получать в пакующей линии клеток, такой как иллюстративная линия клеток НЕК 293Т, посредством введения плазмид, обеспечивая получение лентивирусных частиц. В определенных вариантах осуществления пакующие клетки трансфицируют и/или они уже содержат полинуклеотид, кодирующий gag и pol, и полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, такой как антигенный рецептор, например, CAR. В определенных вариантах осуществления пакующая линия клеток необязательно и/или дополнительно трансфицируют и/или она уже содержит

полинуклеотид, кодирующий белок rev. В определенных вариантах осуществления пакующая линия клеток необязательно и/или дополнительно трансфицируют и/или она уже содержит полинуклеотид, кодирующий а ненативный гликопротеин оболочки, такой как VSV-G. В некоторых таких вариантах осуществления, приблизительно через двое суток после трансфекции клеток, например, клеток НЕК 293Т, клеточный супернатант содержит рекомбинантные лентивирусные векторы, которые можно восстанавливать и титровать.

[0609] Восстановленные и/или продуцированные частицы ретровирусного вектора можно использовать для трансдукции клеток-мишеней описанными способами. Затем, в клетках-мишенях, вирусная РНК подвергается обратной транскрипции, импорту в ядро и стабильной интеграции в геном хозяина. Через одни или двое суток после интеграции вирусной РНК, можно детектировать экспрессию рекомбинантного белка, например, антигенного рецептора, такого как CAR.

3. Нуклеиновые кислоты

[0610] В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е., в норме не присутствующими в клетках или образце, полученном из клеток, например, нуклеиновые кислоты, получаемые из другого организма или клеток, которые, например, как правило, не находятся в клетках, подвергаемых инженерии, и/или организме, из которого получают такие клетки. В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты не являются природными, например, нуклеиновая кислота, являющаяся неприродной, включая нуклеиновые кислоты, содержащие химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из нескольких различных типов клеток.

[0611] В определенных вариантах осуществления клетки содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, вводимых посредством генетической инженерии, и таким образом, экспрессируют рекомбинантные или подвергнутые генетической инженерии продукты таких нуклеиновых кислот.

[0612] В определенных случаях последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. В определенных аспектах сигнальная последовательность может кодировать сигнальный пептид, получаемый из нативного полипептида. В других аспектах, сигнальная последовательность может кодировать гетерологичный или ненативный сигнальный пептид, такой как иллюстративный сигнальный пептид из альфа-цепи GMCSFR, указанный в SEQ ID NO:25 и кодируемый нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:24. В определенных случаях последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, например, химерный антигенный рецептор (CAR), содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Неограничивающие иллюстративные примеры сигнальных пептидов включают, например, сигнальный пептид альфа-цепи GMCSFR, указанный в SEQ ID NO:25 и кодируемый нуклеотидной

последовательностью, указанной в SEQ ID NO:24, или сигнальный пептид CD8 альфа, указанный в SEQ ID NO:26.

[0613] В определенных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор содержит по меньшей мере один промотор, который функционально связан с контролем экспрессии рекомбинантного рецептора. В определенных примерах полинуклеотид содержит два, три или более промоторов, функционально связанных с контролем экспрессии рекомбинантного рецептора.

[0614] В определенных случаях, когда молекулы нуклеиновых кислот кодируют две или более различных полипептидных цепи, например, рекомбинантный рецептор и маркер, каждую из полипептидных цепей может кодировать отдельная молекула нуклеиновой кислоты. Например, предоставлены две отдельных нуклеиновых кислоты, и каждую можно отдельно переносить или вводить в клетку для экспрессии в клетке. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, и нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связаны одним промотором и необязательно разделены внутренним участком связывания рибосомы (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, вызывающий прорыв рибосомы, который необязательно представляет собой T2A, P2A, E2A или F2A. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связаны с двумя различными промоторами. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, находятся или встроены в различных положениях генома клетки. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор введен в композицию, содержащую культивируемые клетки, например, посредством ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

[0615] В определенных вариантах осуществления, таких как варианты осуществления, где полинуклеотид содержит первую и вторую последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие последовательности, каждая из которых кодирует различные полипептидные цепи, могут быть функционально связаны с промотором, который может быть одним и тем же или отличаться для каждой из них. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты может содержать промотор, который контролирует экспрессию двух или более различных полипептидных цепей. В определенных вариантах осуществления такие молекулы нуклеиновых кислот могут быть мультицистронными (бицистронными или трицистронными, см. например, патент США № 6060273). В определенных вариантах осуществления единицы транскрипции можно конструировать в виде бицистронной единицы, содержащей IRES (внутренний участок связывания рибосомы), который обеспечивает коэкспрессию генных продуктов (например, кодируемого маркера и кодируемого рекомбинантного рецептора) посредством информационной последовательности с одного промотора.

[0616] Альтернативно, в определенных случаях один промотор может контролировать экспрессию РНК, которая в одной рамке считывания (ORF) содержит два или три гена (например, кодируемый маркер и кодируемый рекомбинантный рецептор), разделенные друг от друга последовательностями, кодирующими саморасщепляющийся пептид (например, последовательности 2A) или участок распознавания протеазы (например, фурина). Таким образом ORF кодирует один полипептид, который во время (в случае 2A) или после трансляции процессируется в отдельные белки. В определенных случаях пептид, такой как Т2А, может вызывать пропуск рибосомой (проскок рибосомы) синтеза пептидной связи на С-конце элемента 2А, что приводит к разделению конца последовательности 2А и следующего пептида далее по цепи (см., например, de Felipe, *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) and de Felipe et al. *Traffic* 5:616-626 (2004)). Известны различные элементы 2А. Примеры последовательности 2А, которые можно использовать в способах и системах, описываемых в настоящем документе, без ограничений, включают последовательности 2А вируса ящура (F2А, например, SEQ ID NO:21), вируса ринита А лошадей (E2А, например, SEQ ID NO:20), вируса *Thosea asigna* (T2А, например, SEQ ID NO:6 или 17) и тешовируса свиней-1 (P2А, например, SEQ ID NO:18 или 19), как описано в патентной публикации США № 20070116690.

[0617] Любой из рекомбинантных рецепторов, описываемых в настоящем документе, могут кодировать полинуклеотиды, содержащие один или несколько последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные рецепторы, в любых комбинациях или конфигурациях. Например, один, два, три или более полинуклеотида могут кодировать один, два, три или более различных полипептида, например, рекомбинантных рецептора. В определенных вариантах осуществления один вектор или одна конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую маркер, а другой вектор или другая конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, например, CAR. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связаны с двумя различными промоторами. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, находится ниже нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер.

[0618] В определенных вариантах осуществления каркас вектора содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько маркеров. В определенных вариантах осуществления один или несколько маркеров представляют собой маркеры трансдукции, суррогатные маркеры и/или селективные маркеры.

[0619] В определенных вариантах осуществления маркер представляет собой маркер трансдукции или суррогатный маркер. Маркер трансдукции или суррогатный маркер можно использовать для детекции клеток, которым ввели полинуклеотид, например, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В определенных вариантах осуществления маркер трансдукции может указывать на модификацию клетки

или подтверждать ее. В определенных вариантах осуществления суррогатный маркер представляет собой белок, который делают коэкспрессируемым на клеточной поверхности с рекомбинантным рецептором, например, CAR. В конкретных вариантах осуществления такой суррогатный маркер представляет собой поверхностный белок, который модифицирован так, чтобы обладать небольшой или не обладать активностью. В определенных вариантах осуществления суррогатный маркер кодирует тот же полинуклеотид, который кодирует рекомбинантный рецептор. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер, необязательно отделенной внутренним участком связывания рибосомы (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, вызывающий проскок рибосомы, такой как последовательность 2A, такая как T2A, P2A, E2A или F2A. Гены внешних маркеров в определенных случаях можно использовать для подвергнутых инженерии клеток для обеспечения детекции или отбора клеток и, в определенных случаях, также стимуляции суицида клеток.

[0620] Иллюстративные суррогатные маркеры могут включать укороченные полипептиды клеточной поверхности, такие как укороченный рецептор эпидермального фактора роста 2 человека (tHER2), укороченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFR_t, иллюстративную последовательность EGFR_t, указанную в SEQ ID NO:7 или 16) или простатспецифический мембранный антиген (PSMA) или его модифицированную форму. EGFR_t может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимаб (эрбитукс®) или другим терапевтическим антителом к EGFR или молекулой связывания, которые можно использовать для идентификации или отбора клеток, которые подвергнуты инженерии конструкцией EGFR_t и рекомбинантным рецептором, таким как химерный антигенный рецептор (CAR), и/или для устранения или отделения клеток, экспрессирующих рецептор. См. патент США № 8802374 и Liu et al., *Nature Biotech.* 2016 April; 34(4): 430-434). В определенных аспектах маркер, например, суррогатный маркер, включает весь или часть (например, укороченную форму) CD34, NGFR, CD19 или укороченный CD19, например, укороченный не принадлежащий человеку CD19, или рецептор эпидермального фактора роста (например, tEGFR). В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как последовательность расщепляемого линкера, например, T2A. Например, маркер и, необязательно, линкерная последовательность, могут быть любыми, как описано в публикации PCT № WO2014031687. Например, маркер может представлять собой укороченный EGFR (tEGFR), который необязательно связан с линкерной последовательностью, такой как последовательность расщепляемого линкера T2A. Иллюстративный полипептид укороченного EGFR (например, tEGFR) содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:7 или 16 или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную последовательностям SEQ ID NO:7 или 16.

[0621] В определенных вариантах осуществления маркер представляет собой или содержит флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперсложенный GFP, красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-зеленый флуоресцентный белок (BFP), усиленный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP) и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты и оптимизированные по кодонам и/или усиленные варианты флуоресцентных белков. В определенных вариантах осуществления маркер представляет собой или содержит фермент, такой как люцифераза, ген *lacZ* *E. coli*, щелочную фосфатазу, секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT). Иллюстративные светоиспускающие репортерные гены включают люциферазу (*luc*), β -галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), β -глюкуронидазу (GUS) или их варианты.

[0622] В определенных вариантах осуществления маркер представляет собой селективный маркер. В определенных вариантах осуществления селективный маркер представляет собой или содержит полипептид, который придает устойчивость экзогенным средствам или лекарственным средствам. В определенных вариантах осуществления селективный маркер представляет собой ген устойчивости к антибиотикам. В определенных вариантах осуществления селективный маркер представляет собой ген устойчивости к антибиотикам, придающий устойчивость клеткам млекопитающего к антибиотикам. В определенных вариантах осуществления селективный маркер представляет собой или содержит 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 модифицированные формы.

D. Культивирование и/или выращивание клеток

[0623] В определенных вариантах осуществления клетки, подвергнутые инженерии способами, описываемыми в настоящем документе, могут проходить один или несколько этапов культивирования, например, культивирование клеток в условиях, которые стимулируют пролиферацию и/или рост. В определенных вариантах осуществления подвергнутые инженерии клетки культивируют в условиях, которые стимулируют пролиферацию и/или рост с последующим этапом генетической инженерии, например, введение рекомбинантного полипептида в клетки посредством трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют после инкубации клеток в стимулирующих условиях и трансдукции или трансфекции рекомбинантным полинуклеотидом, например, полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. В определенных вариантах осуществления культивирование

позволяет получать одну или несколько культивируемых композиций, обогащенных Т-клетками. В определенных вариантах осуществления такие условия могут быть предназначены для индукции пролиферации, роста, активации и/или жизнеспособности клеток в популяции. В конкретных вариантах осуществления стимулирующие условия могут включать одно или несколько из конкретной среды, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, средств, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие средства, предназначенные для стимуляции роста, деления и/или разрастания клеток.

[0624] В определенных вариантах осуществления подвергнутые инженерии клетки культивируют в контейнере, который можно наполнять, например, через загрузочное отверстие, клетками среды и/или клетками для культивирования добавляемых клеток. Клетки могут происходить из любого источника клеток, для которого необходимо культивирование клеток, например, для роста и/или пролиферации клеток.

[0625] В определенных аспектах среда для культивирования представляет собой адаптированную среду для культивирования, которая поддерживает рост, культивирование, наращивание или пролиферацию клеток, таких как Т-клетки. В определенных аспектах среда может представлять собой жидкость, содержащую смесь солей, аминокислот, витаминов, сахаров или любое их сочетание. В определенных вариантах осуществления среды для культивирования дополнительно включают одно или несколько стимулирующих условий или средств, например, для стимуляции культивирования, роста или пролиферации клеток при инкубации. В определенных вариантах осуществления стимулирующие условия представляет собой или включают один или несколько цитокинов, например, выбранных из IL-2, IL-7 или IL-15. В определенных вариантах осуществления цитокин представляет собой рекомбинантный цитокин. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины человека. В определенных вариантах осуществления один или несколько цитокинов связываются и/или способны к связыванию с рецепторами, которые экспрессированы на Т-клетках и/или являются эндогенными для них. В конкретных вариантах осуществления один или несколько цитокинов представляют собой или включают представителя семейства цитокинов с пучком 4 альфа-спиралей. В определенных вариантах осуществления представители семейства цитокинов с пучком 4 альфа-спиралей в качестве неограничивающих примеров включают 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 определенных вариантах осуществления 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.

[0626] В определенных вариантах осуществления концентрация одного или нескольких цитокинов в средах для культивирования при культивировании или инкубации, независимо, составляет или приблизительно составляет от 1 МЕ/мл до 1500 МЕ/мл, например, точно или приблизительно от 1 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 2 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 5 МЕ/мл до 10 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 250 МЕ/мл или от 100 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 1500 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл или от 200 МЕ/мл до 600 МЕ/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация одного или нескольких цитокинов, независимо, составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1 МЕ/мл, 5 МЕ/мл, 10 МЕ/мл, 50 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 500 МЕ/мл, 1000 МЕ/мл или 1500 МЕ/мл.

[0627] В определенных аспектах клетки инкубируют в течение по меньшей мере части времени после переноса подвергнутых инженерии клеток и среды для культивирования. В определенных вариантах осуществления стимулирующие условия, как правило, включают температуру, подходящую для роста первичных иммунных клеток, таких как Т-лимфоциты человека, например, по меньшей мере приблизительно 25 градусов Цельсия, как правило, по меньшей мере приблизительно 30 градусов и, как правило, точно или приблизительно 37 градусов Цельсия. В определенных вариантах осуществления композицию, обогащенную Т-клетками, инкубируют при температуре от 25 до 38°C, например, от 30 до 37°C, например, точно или приблизительно 37°C $\pm$ 2°C. В определенных вариантах осуществления инкубацию проводят в течение определенного периода времени до культивирования, например, культивирования или выращивания, что приводит к требуемым или пороговым значениям плотности, концентрации, количества или дозы клеток. В определенных вариантах осуществления инкубацию проводят в течение определенного периода времени до культивирования, например, культивирования или выращивания, что приводит к требуемым или пороговым значениям плотности, концентрации, количества или дозы жизнеспособных клеток. В определенных вариантах осуществления инкубацию проводят в течение более чем или более чем приблизительно или в течение приблизительно 24 часов, 48 часов, 72 часов, 96 часов, 5 суток, 6 суток, 7 суток, 8 суток, 9 суток или более.

[0628] В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют в условиях поддержания заданного количества диоксида углерода в культуре клеток. В определенных аспектах это обеспечивает оптимальное культивирование, рост и пролиферацию клеток в течение роста. В определенных аспектах количество диоксида углерода (CO₂) составляет от 10% до 0% (об./об.) указанного газа, например, от 8% до 2% (об./об.) указанного газа, например, содержание составляет или приблизительно составляет 5% (об./об.) CO₂.

[0629] В конкретных вариантах осуществления культивирование проводят в закрытой системе. В определенных вариантах осуществления культивирование проводят в закрытой системе в стерильных условиях. В конкретных вариантах осуществления

культивирование проводят в той же закрытой система что и один или несколько этапов предоставляемых систем. В определенных вариантах осуществления композиция, обогащенную Т-клетками, удаляют из закрытой системы и помещают и/или соединяют с биореактором для культивирования. Примеры подходящих биореакторов для культивирования в качестве неограничивающих примеров включают GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20 | 50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems и Pall XRS Bioreactor Systems. В определенных вариантах осуществления биореактор используют для опрыскивания и/или смешивания клеток в течение по меньшей мере части этапа культивирования.

[0630] В определенных вариантах осуществления клетки, культивируемые в закрытом состоянии, связанные и/или находящиеся под контролем биореактора, растут во время культивирования быстрее, чем клетки, которые культивируют без биореактора, например клетки, которые культивируют в статических условиях, например, без перемешивания, встряхивания, качания и/или перфузии. В определенных вариантах осуществления клетки, культивируемые в закрытом состоянии, связанные и/или находящиеся под контролем биореактора, достигают порогового значения роста, количества клеток и/или плотности в пределах 14 суток, 10 суток, 9 суток, 8 суток, 7 суток, 6 суток, 5 суток, 4 суток, 3 суток, 2 суток, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов или 12 часов. В определенных вариантах осуществления клетки, культивируемые в закрытом состоянии, связанные и/или находящиеся под контролем биореактора, достигают порогового значения роста, количества клеток и/или плотности по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз чем клетки культивируемые в иллюстративном и/или альтернативном процессе, где клетки не культивируют в закрытом состоянии, связанными и/или под контролем биореактора.

[0631] В определенных вариантах осуществления смешивание представляет собой или включает покачивания и/или перемещение. В определенных вариантах осуществления клетки инкубируют с использованием контейнеров, например, пакетов, которые используют в связи с биореактором. В определенных случаях биореактор можно подвергать перемещению или покачиванию, что в определенных аспектах может увеличить перенос кислорода. Перемещение биореактора может включать в качестве неограничивающих примеров вращение по горизонтальной оси, вращение по вертикальной ось, качание по наклонной горизонтальной оси биореактора или любое их сочетание. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации проводят с покачиванием. Скорость покачивания и угол наклона можно регулировать для достижения требуемого перемешивания. В определенных вариантах осуществления угол наклона составляет или приблизительно составляет 20°, 19°, 18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2° или 1°. В определенных вариантах осуществления

угол наклона составляет 6-16°. В других вариантах осуществления угол наклона составляет 7-16°. В других вариантах осуществления угол наклона составляет 8-12°. В определенных вариантах осуществления скорость вращения составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 об./мин. В определенных вариантах осуществления скорость вращения составляет от 4 до 12 об./мин., например, от 4 до 6 об./мин., включительно. По меньшей мере часть роста культуры клеток проводят с качанием, например, на угол от 5° до 10°, например, 6°, при постоянной скорости вращения, например, скорости от 5 до 15 об./мин., например, 6 об./мин. или 10 об./мин.

[0632] В определенных вариантах осуществления композицию, содержащую клетки, такие как подвергнутые инженерии Т-клетки, например, подвергнутые инженерии CD4⁺ Т-клетки, или подвергнутые инженерии CD8⁺ Т-клетки, или подвергнутые инженерии клетки любого фенотипа, как описано в настоящем документе, культивируют в присутствии поверхностно-активного вещества. В конкретных вариантах осуществления культивирование клеток композиции уменьшает уровень касательного напряжения, которое может возникать при культивировании, например, вследствие перемешивания, качания, перемещения и/или перфузии. В конкретных вариантах осуществления композицию клеток, такую как подвергнутые инженерии Т-клетки, например, подвергнутые инженерии CD4⁺ Т-клетки или подвергнутые инженерии CD8⁺ Т-клетки, культивируют с поверхностно-активным веществом и по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,9% Т-клеток выживают, например, жизнеспособны и/или претерпевают некроз, программируемую гибель клеток или апоптоз в течение или по меньшей мере 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 7 суток или более чем 7 суток после завершения культивирования. В конкретных вариантах осуществления композицию клеток, таких как подвергнутые инженерии Т-клетки, например, подвергнутые инженерии CD4⁺ Т-клетки или подвергнутые инженерии CD8⁺ Т-клетки, культивируют в присутствии поверхностно-активного вещества и менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% клеток претерпевают гибель клеток, например, программируемую гибель клеток, апоптоз и/или некроз, например, вследствие сдвига или индуцированного сдвигом напряжения.

[0633] В конкретных вариантах осуществления композицию клеток, таких как подвергнутые инженерии Т-клетки, например, подвергнутые инженерии CD4⁺ Т-клетки или подвергнутые инженерии CD8⁺ Т-клетки, культивируют в присутствии от 0,1 мкл/мл до 10,0 мкл/мл, от 0,2 мкл/мл до 2,5 мкл/мл, от 0,5 мкл/мл до 5 мкл/мл, от 1 мкл/мл до 3 мкл/мл или от 2 мкл/мл до 4 мкл/мл поверхностно-активного вещества. В определенных вариантах осуществления композицию клеток, таких как подвергнутые инженерии Т-клетки, например, подвергнутые инженерии CD4⁺ Т-клетки или подвергнутые инженерии

CD8⁺ Т-клетки, культивируют в присутствии, приблизительно или по меньшей мере 0,1 мкл/мл, 0,2 мкл/мл, 0,4 мкл/мл, 0,6 мкл/мл, 0,8 мкл/мл, 1 мкл/мл, 1,5 мкл/мл, 2,0 мкл/мл, 2,5 мкл/мл, 5,0 мкл/мл, 10 мкл/мл, 25 мкл/мл, или 50 мкл/мл поверхностно-активного вещества. В определенных вариантах осуществления композицию клеток культивируют в присутствии или приблизительно 2 мкл/мл поверхностно-активного вещества.

[0634] В определенных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой или содержит средство, которое снижает поверхностное натяжение жидкостей и/или твердых веществ. Например, поверхностно-активное вещество включает жирный спирт (например, стерильный спирт), простой эфир полиоксиэтиленгликоля и октилфенола (например, Triton X-100) или сложный эфир полиоксиэтиленгликоля и сорбитаналкил (например, полисорбат 20, 40, 60). В определенных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата 80 (PS80), полисорбата 20 (PS20), полксамера 188 (P188). В иллюстративном варианте осуществления концентрация поверхностно-активного вещества в химически определенных питательных средах составляет приблизительно от 0,0025% до приблизительно 0,25% (об./об.) PS80; приблизительно от 0,0025% до приблизительно 0,25% (об./об.) PS20 или приблизительно от 0,1% до приблизительно 5,0% (масс./об.) P188.

[0635] В определенных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой или содержит анионное поверхностно-активное вещество, катионное поверхностно-активное вещество, цвиттер-ионное поверхностно-активное вещество или неионное поверхностно-активное вещество, добавляемое к ним. Подходящие анионные поверхностно-активные вещества в качестве неограничивающих примеров включают алкилсульфонаты, алкилфосфаты, алкилфосфонаты, лаурат калия, триэтаноламинстеарат, лаурилсульфат натрия, додецилсульфат натрия, алкилполиоксиэтилсульфаты, альгинат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозин, фосфатидилинозитол, дифосфатидилглицерин, фосфатидилсерин, фосфатидную кислоту и их соли, карбоксиметилцеллюлозу натрия, холевую кислоту и другие желчные кислоты (например, холевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, гликохолевую кислоту, таурохолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту) и их соли (например, дезоксихолат натрия).

[0636] В определенных вариантах осуществления подходящие неионные поверхностно-активные вещества включают: сложные глицериловые эфиры, простые эфиры полиоксиэтилена и жирных спиртов, полиоксиэтиленсорбитановые сложные эфиры жирных кислот (полисорбаты), полиоксиэтиленовые сложные эфиры жирных кислот, сорбитановые сложные эфиры, глицеринмоностеарат, полиэтиленгликоли, полипропиленгликоли, цетиловый спирт, цетостеариловый спирт, стеариловый спирт, арилалкиловые простые полиэфирные спирты, сополимеры полиоксиэтилен-полиоксипропилен (полксамеры), полксамины, метилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу,

некристаллическую целлюлозу, полисахариды, включая крахмал и производные крахмала, такие как гидроксиэтилкрахмал (HES), поливиниловый спирт и поливинилпирролидон. В определенных вариантах осуществления неионное поверхностно-активное вещество представляет собой сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена и предпочтительно блок-сополимер пропиленгликоля и этиленгликоля. Такие полимеры находятся в продаже под торговым наименованием полуксамер, также иногда, обозначаемые как плуроник® F68 или коллифор® P188. В число полиоксиэтиленовых сложных эфиров жирных кислот включены эфиры с короткими алкильными цепями. Одним примером такого поверхностно-активного вещества является солютол® HS 15, полиэтилен-660-гидроксистеарат.

[0637] В определенных вариантах осуществления подходящие катионные поверхностно-активные вещества в качестве неограничивающих примеров могут включать природные фосфолипиды, синтетические фосфолипиды, соединения четвертичного аммония, хлорид бензалкония, бромид цетилтриметиламмония, хитозаны, лаурилдиметилбензилхлорид аммония, ацилкарнитингидрохлориды, бромид диметилдиоктадециламмония (DDAB), диолеилтриметиламмонийпропан (DOTAP), димиристоилтриметиламмонийпропан (DMTAP), диметиламиноэтанкарбамоилхолестерин (DC-Chol), 1,2-диацилглицеро-3-(О-алкил)фосфохолин, О-алкилфосфатидилхолин, галогениды алкилпиридиния или алкиламины с длинной цепью, такие как, например, н-октиламин и олеиламин.

[0638] Цвиттер-ионные поверхностно-активные вещества являются электрически нейтральными, но обладают локальными положительными и отрицательными зарядами в пределах одной молекулы. Подходящие цвиттер-ионные поверхностно-активные вещества в качестве неограничивающих примеров включают цвиттер-ионные фосфолипиды. Подходящие фосфолипиды включают фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, диацилглицерофосфоэтаноламин (такой димиристоилглицерофосфоэтаноламин (DMPE), дипальмитоилглицерофосфоэтаноламин (DPPE), дистеароилглицерофосфоэтаноламин (DSPE) и диолеилглицерофосфоэтаноламин (DOPE)). По настоящему изобретению можно использовать смеси фосфолипидов, которые включают анионные и цвиттер-ионные фосфолипиды. Такие смеси в качестве неограничивающих примеров включают лизофосфолипиды, яичные или соевые фосфолипиды или любое их сочетание. Фосфолипид, анионный, цвиттер-ионный или смесь фосфолипидов, могут находиться в форме соли или быть обессоленными, гидрогенизированными или частично гидрогенизированными или природными, полусинтетическими или синтетическими.

[0639] В определенных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полуксамер, например, полуксамер 188. В определенных вариантах осуществления композицию клеток культивируют в присутствии от 0,1 мкл/мл до 10,0 мкл/мл, от 0,2 мкл/мл до 2,5 мкл/мл, от 0,5 мкл/мл до 5 мкл/мл, от 1 мкл/мл до 3 мкл/мл, или от 2 мкл/мл до 4 мкл/мл полуксамера. В определенных вариантах осуществления

композицию клеток культивируют в присутствии приблизительно или по меньшей мере 0,1 мкл/мл, 0,2 мкл/мл, 0,4 мкл/мл, 0,6 мкл/мл, 0,8 мкл/мл, 1 мкл/мл, 1,5 мкл/мл, 2,0 мкл/мл, 2,5 мкл/мл, 5,0 мкл/мл, 10 мкл/мл, 25 мкл/мл или 50 мкл/мл поверхностно-активного вещества. В определенных вариантах осуществления композицию клеток культивируют в присутствии или приблизительно 2 мкл/мл полоксамера.

[0640] В определенных аспектах CD4⁺- и CD8⁺-клетки наращивают, в определенных случаях каждые наращивают отдельно или наращивают совместно, до достижения ими порогового значения количества или плотности клеток. В конкретных вариантах осуществления культивирование заканчивается, например, сбором клеток, когда клетки достигают порогового значения количества, концентрации и/или роста. В конкретных вариантах осуществления культивирование заканчивается, когда клетки достигают или достигают приблизительно или по меньшей мере 1,5-кратной величины, 2-кратной величины, 2,5-кратной величины, 3-кратной величины, 3,5-кратной величины, 4-кратной величины, 4,5-кратной величины, 5-кратной величины, 6-кратной величины, 7-кратной величины, 8-кратной величины, 9-кратной величины, 10-кратной величины или более чем 10-кратной величины, например, в отношении и/или относительно величины плотности клеток на старте или в начале культивирования. В определенных вариантах осуществления пороговое значение роста представляет собой 4-кратную величину, например, в отношении и/или относительно величины плотности клеток на старте или в начале культивирования. В определенных вариантах осуществления культивирование заканчивается, например сбором клеток, когда клетки достигают порогового значения общего количества клеток, например, порогового значения количества клеток. В определенных вариантах осуществления культивирование заканчивается, когда клетки достигают порогового значения общего количества ядродержащих клеток (TNC). В определенных вариантах осуществления культивирование заканчивается, когда клетки достигают порогового значения количества жизнеспособных клеток, например, порогового значения количества жизнеспособных клеток. В определенных вариантах осуществления пороговое значение количества клеток составляет или приблизительно составляет или по меньшей мере составляет 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, 4000×10^6 клеток, 5000×10^6 клеток, 10000×10^6 клеток, 12000×10^6 клеток, 15000×10^6 клеток или 20000×10^6 клеток или любое из указанных выше пороговых значений жизнеспособных клеток.

[0641] В конкретных вариантах осуществления культивирование заканчивается, когда клетки достигают порогового значения количества клеток. В определенных вариантах осуществления культивирование заканчивается точно, приблизительно или в пределах 6 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов, 1 сутки, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток или 7 или более суток после достижения клетками порогового значения количества клеток. В конкретных вариантах осуществления культивирование заканчивается точно

или приблизительно через 1 сутки после достижения порогового значения количества клеток. В определенных вариантах осуществления пороговое значение плотности составляет приблизительно или составляет по меньшей мере $0,1 \times 10^6$ клеток/мл, $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, 1×10^6 клеток/мл, $1,2 \times 10^6$ клеток/мл, $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, $1,6 \times 10^6$ клеток/мл, $1,8 \times 10^6$ клеток/мл, $2,0 \times 10^6$ клеток/мл, $2,5 \times 10^6$ клеток/мл, $3,0 \times 10^6$ клеток/мл, $3,5 \times 10^6$ клеток/мл, $4,0 \times 10^6$ клеток/мл, $4,5 \times 10^6$ клеток/мл, $5,0 \times 10^6$ клеток/мл, 6×10^6 клеток/мл, 8×10^6 клеток/мл или 10×10^6 клеток/мл или любое из указанных выше пороговых значений жизнеспособных клеток. В конкретных вариантах осуществления культивирование заканчивается, когда клетки достигают порогового значения плотности. В определенных вариантах осуществления культивирование заканчивается точно, приблизительно или в пределах 6 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов, 1 сутки, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток или 7 или более суток после достижения порогового значения плотности. В конкретных вариантах осуществления культивирование заканчивается точно или приблизительно через 1 сутки после достижения порогового значения плотности.

[0642] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации проводят в статических условиях. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации проводят с перфузией, например, для с выводом отработанной среды и вводом свежей среды во время культивирования. В определенных вариантах осуществления способ включает этап перфузии свежей среда для культивирования в культуру клеток, например, через загрузочное отверстие. В определенных вариантах осуществления среды для культивирования, добавляемые при перфузии, содержат одно или несколько стимулирующих средств, например, один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как IL-2, IL-7 и/или IL-15. В определенных вариантах осуществления среды для культивирования, добавляемые при перфузии, являются теми же средами для культивирования, которые используют при статической инкубации.

[0643] В определенных вариантах осуществления после инкубации контейнер, например, пакет, повторно соединяют с системой для проведения одного или нескольких других этапов обработки или для производства, получения или продукции клеточного терапевтического средства, например, повторно соединяют с системой, содержащей камеру центрифуги. В определенных аспектах культивируемые клетки переносят из пакета во внутреннюю полость камеры для формулирования культивируемых клеток.

[0644] В определенных вариантах осуществления Т-клетки наращивают посредством добавления в композицию начальной культуры фидерных клеток, таких как неделящиеся моноклеарные клетки периферической крови (РВМС), (например, так, что полученная популяция клеток содержит по меньшей мере приблизительно 5, 10, 20 или 40 или более фидерных клеток РВМС на каждый Т-лимфоцит в исходной популяции для наращивания); и инкубации культуры (например, в течение периода времени, достаточного для наращивания требуемого количества Т-клеток). В определенных аспектах неделящиеся фидерные клетки могут содержать облученные гамма-лучами

фидерные клетки РВМС. В определенных вариантах осуществления РВМС облучают гамма-лучами в диапазоне приблизительно от 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В определенных аспектах фидерные клетки добавляют в среду для культивирования перед добавлением популяций Т-клеток.

Е. Композиции и составы

[0645] Способами, предоставленными в настоящем документе, можно получать выходящую композицию подвергнутых инженерии клеток (например, Т-клеток) с конкретными фенотипическими и функциональными характеристиками. В определенных вариантах осуществления выходящую композицию можно формулировать, например, в терапевтическую или фармацевтическую композицию или состав. Таким образом, также предоставлены композиции (например, выходящие композиции), содержащие любые клетки и/или дозы клеток, такие как композиции стандартных лекарственных форм, содержащие количество клеток для введения в данной дозе или ее части, включая фармацевтические композиции и составы. Фармацевтические композиции и составы, как правило, содержат один или несколько необязательных фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. В определенных вариантах осуществления доза клеток, содержащих клетки, подвергнутые инженерии рекомбинантным антигенным рецептором, например, CAR или TCR, предоставлена в качестве композиции или состава, такого как фармацевтическая композиция или состав. Такие композиции можно использовать предоставляемыми способами и/или с использованием предоставляемых промышленных изделий или композиций, например, в профилактике или лечении заболеваний, патологических состояний и нарушений, или в способах детекции, диагностики и прогноза. В определенных вариантах осуществления также предоставлены любая из стандартных доз, описываемых в настоящем документе, и/или композиции, содержащие любую из стандартных доз клеток, описываемых в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления композиция представляет собой выходящую композицию.

[0646] В определенных вариантах осуществления доза клеток, содержащих клетки, подвергнутые инженерии рекомбинантным антигенным рецептором, например, CAR или TCR, предоставлены в виде композиции или состава, таких как фармацевтическая композиция или состав. Такие композиции можно использовать способами адоптивной клеточной терапии, включая способы профилактики или лечения заболеваний, патологических состояний и нарушений, или в способах детекции, диагностики и прогноза. В определенных вариантах осуществления такие композиции или составы можно хранить, содержать или переносить в предоставляемые сосуды из биомедицинских материалов и/или в качестве компонента предоставляемых промышленных изделий.

[0647] В определенных случаях клетки обрабатывают на одном или нескольких этапах (например, проводимых в камере центрифуги и/или закрытой системе) для производства, получения или продукции клеточного терапевтического средства и/или подвергнутые инженерии клетки могут включать состав клеток, такой как состав подвергнутых генетической инженерии клеток, являющийся результатом

предоставляемых этапов обработки трансдукции до или после культивирования, например, культивирования и наращивания, и/или одного или нескольких других этапов обработки, как описано. В определенных случаях клетки можно формулировать в количестве для введения дозы, например, для введения одной единицы дозирования или введения нескольких доз. В определенных вариантах осуществления предоставляемые способы, связанные с формулированием клеток, включают обработку трансдуцированных клеток, таких как клетки, трансдуцированные и/или выращенные на этапах обработки, описанных выше, в закрытой системе. В определенных вариантах осуществления формулируемые клетки можно переносить или вносить в сосуды из биомедицинских материалов, например, флаконы, предоставляемые по настоящему документу.

[0648] В определенных вариантах осуществления формулируют одну или несколько композиций клеток (например, выходящая композиция), таких как подвергаемые инженерии и культивированию Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления одну или несколько композиций клеток, таких как подвергаемые инженерии и культивированию Т-клетки, формулируют после подвергания одной или нескольких композиций инженерии и/или культивированию.

[0649] В определенных вариантах осуществления формулируют Т-клетки, такие как $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клетки, получаемые на одном или нескольких этапах обработки. В определенных аспектах множество композиций производят, продуцируют или получают раздельно, где каждая содержит различные популяции и/или подтипы клеток индивидуума, например, для введения раздельно или независимо, необязательно в течение определенного периода времени. Например, отдельные составы подвергнутых инженерии клеток, содержащие различные популяции или подтипы клеток могут включать $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки, соответственно, и/или обогащенные $CD8^+$ - и $CD4^+$ -клетками популяции, соответственно, например, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клетками, где каждый отдельно содержит клетки, подвергнутые генетической инженерии с экспрессией рекомбинантного рецептора. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одну композицию формулируют с $CD4^+$ Т-клетками, подвергнутыми генетической инженерии с экспрессией рекомбинантного рецептора. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одну композицию формулируют с $CD8^+$ Т-клетками, подвергнутыми генетической инженерии с экспрессией рекомбинантного рецептора. В определенных вариантах осуществления введение дозы включает введение первой композиции, содержащей дозу $CD8^+$ Т-клеток или дозу $CD4^+$ Т-клеток, и введение второй композиции, содержащей другую из доз $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления первая композиция, содержащая дозу $CD8^+$ Т-клетки или дозу $CD4^+$ Т-клеток, вводят до второй композиции, содержащая другую из доз $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления введение дозы включает введение композиции, содержащей и дозу $CD8^+$ Т-клеток, и дозу $CD4^+$ Т-клеток.

[0650] В определенных вариантах осуществления клетки (такие как подвергнутые инженерии клетки) обогащены или отсортированы, например, в конце или ближе к концу

способа получения до формулирования на основе поверхностной экспрессии одного или нескольких маркеров требуемого фенотипа, например, экспрессии CCR7 или CD27, например, с обеспечением того, что по меньшей мере конкретный процент (такой как по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) или количество клеток (или их подмножества) во вводимой терапевтической композиции являются позитивными по такому маркеру.

[0651] В определенных вариантах осуществления одна или несколько композиций клеток (например, выходящая композиция), таких как подвергаемые инженерии и культивируемые Т-клетки, представляют собой или содержат два отдельные композиции, например, отдельные композиции подвергаемых инженерии и/или культивированию клеток. В конкретных вариантах осуществления два отдельные композиции клеток, например, две отдельные композиции $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток отбираемые, выделяемые и/или обогащаемые из одного и того же биологического образца, отдельно подвергаемые инженерии и отдельно культивируемые, формулируют отдельно. В определенных вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию $CD4^+$ Т-клеток, такую как композицию подвергнутых инженерии и/или культивированию $CD4^+$ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию $CD8^+$ Т-клеток, такую как композиция подвергнутых инженерии и/или культивированию $CD8^+$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления две отдельные композиции $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток, такие как отдельные композиции подвергнутых инженерии и культивируемых $CD4^+$ Т-клеток и подвергнутых инженерии и культивированию $CD8^+$ Т-клеток, формулируют отдельно. В определенных вариантах осуществления формулируют одну композицию клеток. В определенных вариантах осуществления одна композиция представляет собой композицию $CD4^+$ Т-клеток, такую как композиция подвергнутых инженерии и/или культивированию $CD4^+$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления одна композиция представляет собой композицию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, которую комбинируют из отдельных композиций до формулирования.

[0652] В определенных вариантах осуществления отдельные композиции $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, такие как отдельные композиции подвергнутых инженерии и культивированию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток (например, выходящие композиции) комбинируют в одну композицию и формулируют. В определенных вариантах осуществления отдельные формулируемые композиции $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток комбинируют в одну композицию после проведения и/или завершения формулирования. В конкретных вариантах осуществления отдельные композиции $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, такие как отдельные композиции подвергнутых инженерии и культивированию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, формулируют отдельно в виде отдельных композиций.

[0653] В определенных вариантах осуществления клетки можно формулировать в контейнер, такой как флакон, такой как любой флакон в сосудах из биомедицинских

материалов, предоставляемых по настоящему документу. В определенных вариантах осуществления клетки формулируют в момент времени от 0 суток до 10 суток, от 0 до 5 суток, от 2 суток до 7 суток, от 0,5 суток до 4 суток или от 1 сутки до 3 суток после достижения клетками при культивировании пороговых значений количества клеток, плотности и/или роста. В определенных вариантах осуществления клетки формулируют в момент времени или точно или приблизительно или в пределах 12 часов, 18 часов, 24 часов, 1 сутки, 2 суток или через 3 суток после достижения при культивировании пороговых значений количества клеток, плотности и/или роста. В определенных вариантах осуществления клетки формулируют в пределах или в пределах приблизительно 1 суток после достижения при культивировании пороговых значений количества клеток, плотности и/или роста.

[0654] В определенных вариантах осуществления клетки формулируют в фармацевтически приемлемом буфере, который в определенных аспектах может включать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В определенных вариантах осуществления обработка включает замену среды на среду или буферный состав, которые являются фармацевтически приемлемыми или необходимыми для введения индивидууму. В определенных вариантах осуществления этапы обработки могут включать отмывку трансдуцированных и/или выращенных клеток с заменой у клеток на фармацевтически приемлемый буфер, который может содержать один или несколько необязательных фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. Иллюстративные варианты таких фармацевтических форм, включающих фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты, могут быть любыми, описанными ниже в сочетании с формами, приемлемыми для введения клеток и композиций индивидууму. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит клетки в количествах, эффективных для лечения или предотвращения заболевания или патологическое состояние, таких как терапевтически эффективные или профилактически эффективные количество.

[0655] Термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает биологическую активность активного ингредиента, содержащегося в ней, являющуюся эффективной, и которая не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для индивидуума, которому нужно вводить состав.

[0656] "Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтическом составе, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для индивидуума. Фармацевтически приемлемый носитель в качестве неограничивающих примеров включает буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

[0657] В определенных аспектах выбор носителя частично определяется конкретными клетками и/или способом введения. Таким образом, существует ряд подходящих составов. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен,

пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. В определенных аспектах используют смесь двух или более консервантов. Как правило, консервант или их смеси находятся в количестве приблизительно от 0,0001% до приблизительно 2% массы общей композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Как правило, фармацевтически приемлемые носители являются нетоксичными реципиентам в используемых дозировках и концентрациях и в качестве неограничивающих примеров включают: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензилхлорид аммония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем 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 друг углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; формирующие соли противоионы, такие как натрий; комплексные соединения с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

[0658] в определенных аспектах в композициях содержатся буферные средства. Подходящие буферные средства включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В определенных аспектах используют смесь двух или более буферных средств. Как правило, буферное средство или их смеси находятся в количестве приблизительно от 0,001% до приблизительно 4% массы общей композиции. Способы получения администрируемых фармацевтических композиций известны. Иллюстративные способы более подробно описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (1 мая 2005 года).

[0659] Составы могут включать водные растворы. Состав или композиция также могут содержать более одного активного ингредиента, пригодного для конкретного показания, заболевания или патологического состояния, подлежащего лечению клетками, предпочтительно ингредиентов с активностью, комплементарной клетками, где соответствующие виды активности не оказывают отрицательного влияния друг на друга. Такие активные ингредиенты соответственно находятся в комбинации в количествах, которые эффективны для назначенной цели. Таким образом, в определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит другие фармацевтически активные средства или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические средства, например, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину,

метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин и/или винкристин. В определенных вариантах осуществления средства или клетки вводят в форме соли, например, фармацевтически приемлемой соли. Подходящие фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот включают соли, получаемые из неорганических кислот, таких как соляная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, и органические кислоты, такие как винная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, фумаровая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная и агулсульфоновая кислоты, например, п-толуолсульфоновая кислота.

[0660] Композиции в определенных вариантах осуществления предоставлены в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые в определенных аспектах могут быть забуференными до выбранного pH. Жидкие композиции могут содержать носители, которые могут представлять собой растворители или диспергирующие среды, содержащие, например, воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Стерильные инъеклируемые растворы можно получать посредством добавления клеток в растворитель, например, в смеси с подходящим носителем, разбавителем или эксципиентом, таким как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза, декстроза или т.п. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как увлажнители, диспергирующие средства или эмульгаторы (например, метилцеллюлозу), средства для буферирования pH, желлирующие или усиливающие вязкость добавки, консерванты, ароматизаторы и/или красители, в зависимости от маршрута введения и требуемого препарат. В определенных аспектах для получения соответствующих препаратов можно консультироваться в стандартных руководствах.

[0661] Можно добавлять различные добавки, которые увеличивают стабильность и стерильность композиций, включая противомикробные консерванты, антиоксиданты, хелатирующие средства и буферы. Предотвращение действия микроорганизмов можно обеспечивать различными противобактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом и сорбиновой кислотой. Длительного всасывания инъеклируемой фармацевтической формы можно достигать применением средств, задерживающих всасывания, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0662] В определенных вариантах осуществления буфер состава содержит криоконсервант. В определенных вариантах осуществления клетки формулируют с раствором криоконсерванта, которые содержат от 1,0% до 30% раствора DMSO, например, от 5% до 20% раствора DMSO или от 5% до 10% раствора DMSO. В определенных вариантах осуществления раствор для криоконсервации представляет собой или содержит, например, PBS, содержащий 20% DMSO и 8% сывороточного альбумина человека (HSA) или другую подходящую среду для заморозки клеток. В определенных вариантах осуществления раствор криоконсерванта представляет собой или содержит, например, по меньшей мере или приблизительно 7,5% DMSO. В определенных

вариантах осуществления этапы обработки могут включать отмывку трансдуцированных и/или выращенных клеток с заменой клеток в растворе криоконсерванта. В определенных вариантах осуществления клетки замораживают, например, подвергают криоконсервации или криопротекции, в среде и/или растворе с конечной концентрацией точно или приблизительно 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9,0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5% или 5,0% DMSO, или от 1% до 15%, от 6% до 12%, от 5% до 10% или от 6% до 8% DMSO. В конкретных вариантах осуществления клетки замораживают, например, подвергают криоконсервации или криопротекции, в среде и/или растворе с конечной концентрацией точно или приблизительно 5,0%, 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,25%, 1,0%, 0,75%, 0,5% или 0,25% HSA, или от 0,1% до 5%, от 0,25% до 4%, от 0,5% до 2% или от 1% до 2% HSA.

[0663] В конкретных вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток, например, Т-клеток, которую подвергали стимуляции, инженерии и/или культивированию, формулируют, подвергают криоконсервации, а затем хранят в течение периода, например, в предоставляемом сосуде из биомедицинских материалов. В определенных вариантах осуществления сформулированные, подвергнутые криоконсервации клетки хранят до высвобождения клеток для инфузии. В конкретных вариантах осуществления сформулированные подвергнутые криоконсервации клетки хранят в течение периода от 1 суток до 6 месяцев, от 1 месяца до 3 месяцев, от 1 суток до 14 суток, от 1 суток до 7 суток, от 3 суток до 6 суток, от 6 месяцев до 12 месяцев или более 12 месяцев. В определенных вариантах осуществления клетки подвергают криоконсервации и хранят в течение, приблизительно в течение или в течение менее 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток или 7 суток. В определенных вариантах осуществления клетки размораживают и вводят индивидууму после хранения. В определенных вариантах осуществления клетки хранят в течение или приблизительно в течение 5 суток.

[0664] В определенных вариантах осуществления формулирование проводят на одном или нескольких этапах обработки, включающих отмывку, разбавление или концентрацию клеток, например культивируемых или выращиваемых клеток. В определенных вариантах осуществления обработка может включать разведение или концентрацию клеток до требуемой концентрации или количества, такие как композиции стандартных лекарственных форм, содержащие количество клеток для введения в данной дозе или ее части. В определенных вариантах осуществления этапы обработки могут включать уменьшение объема для увеличения, таким образом, концентрации клеток, как необходимо. В определенных вариантах осуществления этапы обработки могут включать добавление объема, для уменьшения, таким образом, концентрации клеток, как необходимо. В определенных вариантах осуществления обработка включает добавление объема буфера состава к трансдуцированным и/или выращенным клеткам. В определенных вариантах осуществления объем буфера состава составляет от 10 мл до 1000 мл или приблизительно от 10 мл до приблизительно 1000 мл, например, по меньшей

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

[0665] В определенных вариантах осуществления клетки культивируют, например, стимулируют, подвергают инженерии и/или культивированию в контейнере, например, пакете или камере центрифуги. В определенных аспектах контейнер представляет собой первый контейнер, и культивируемые клетки экспрессируют или переносят из первого контейнера, например, пакета или камеры центрифуги, во второй контейнер, такой как сосуд из биомедицинских материалов, который функционально связан с первым контейнером. В определенных вариантах осуществления сосуды из биомедицинских материалов сконфигурированы для интеграции и/или функционального соединения и/или интегрированы или функционально соединены с первым контейнером, например, пакетом или камерой центрифуги, используемым на одном или нескольких из предыдущих этапах обработки. В определенных вариантах осуществления сосуд из биомедицинских материалов соединен с первым контейнером, например, пакетом или камерой центрифуги, по выходной линии или выходном положении. В определенных случаях первый контейнер, например, пакет или камера центрифуги, соединен с флаконом сосуда из биомедицинских материалов по выпускной трубке.

[0666] В определенных вариантах осуществления такие этапы обработки для формулирования композиции клеток проводят в закрытой системе. Примеры таких этапов обработки можно проводить с использованием камеры центрифуги в сочетании с одной или несколькими системами или наборами, связанными с системой обработки клеток, такой как камера центрифуги, производимой и реализуемой Biosafe SA, включая системы и наборы для применения с системами обработки клеток Sepax® или Sepax 2® . Иллюстративная система и процесс описаны в международной публикации № WO2016/073602. В определенных вариантах осуществления способ включает проведение экспрессии или переноса из внутренней полости камеры центрифуги формулируемой композиции, которая представляет результирующую композицию клеток, сформулированную в буфере состава, таком как фармацевтически приемлемый буфер в любом из описанных выше вариантов осуществления, как описано. В определенных вариантах осуществления экспрессию или перенос формулируемой композиции проводят в контейнере, таком как флаконы сосудов из биомедицинских материалов, описываемые в настоящем документе, который функционально связан, как часть закрытой системы, с камерой центрифуги. В определенных вариантах осуществления сосуды из биомедицинских материалов сконфигурированы для интеграции и или функционального соединения и/или интегрированы или функционально соединены с закрытой системой или устройством, в котором проводят один или несколько этапов обработки. В определенных вариантах осуществления сосуд из биомедицинских материалов соединен с системой по выходной линии или во выходном положении. В определенных случаях закрытая система соединен с флаконом сосуда из биомедицинских материалов по выпускной трубке.

Иллюстративная закрытая система для применения с сосудами из биомедицинских материалов, описываемая в настоящем документе, включают систему Sepax® и Sepax® 2.

[0667] В определенных вариантах осуществления композицию можно переносить из первого контейнера, такого как камера центрифуги или система обработки клеток, в предоставляемые сосуды из биомедицинских материалов посредством многопортового выводного комплекта, содержащего многоходовой трубопроводный коллектор, соединенный на каждом конце линии трубок с портом с которым могут быть соединены один или множество контейнеров, например, сосудов из биомедицинских материалов для экспрессии формулируемой композиции. В определенных аспектах требуемое количество или множество таких флаконов можно стерильно соединять с одним или несколькими, как правило, двумя или более, например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более портами многопортового выхода. Например, в определенных вариантах осуществления один или несколько контейнеров, например, сосудов из биомедицинских материалов, можно соединять с портами, или с менее чем со всеми портами. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в системе можно проводить экспрессию выходящей композиции во множестве флаконов сосудов из биомедицинских материалов.

[0668] В определенных аспектах клетки можно экспрессировать или переносить в один или несколько множества выходных контейнеров, например, флаконов сосудов из биомедицинских материалов, в количество для дозируемого введения, таком как для введения единицы дозирования или введения нескольких доз. Например, в определенных вариантах осуществления каждый из флаконов сосудов из биомедицинских материалов может содержать количество клеток для введения в данной дозе или ее части. Таким образом, в определенных аспектах, каждый флакон может содержать одну стандартную дозу для введения или может содержать часть требуемой дозы так, что дозу для введения вместе составляют более одного из множества флаконов, например, два флакона или 3 флакона.

[0669] Таким образом, флаконы в сосудах из биомедицинских материалов, описываемых в настоящем документе, как правило, содержат клетки для введения, например, одну или несколько их стандартных доз. Стандартная доза может представлять собой количество клеток для введения индивидууму или двойное количество (или более) клеток для введения. Оно может представлять собой наименьшую дозу или наименьшую возможную дозу клеток, которую можно вводить индивидууму.

[0670] В определенных вариантах осуществления каждый из флаконов индивидуально содержит стандартную дозу клеток. Таким образом, в определенных вариантах осуществления каждый из контейнеров содержит одно и то же или приблизительно или по существу одно и то же количество клеток. В определенных вариантах осуществления каждая стандартная 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 , 1×10^8 , $2,5 \times 10^8$ или 5×10^8 подвергнутых инженерии клеток, всех клеток, Т-клеток или РВМС. В определенных вариантах осуществления каждая стандартная доза содержит по меньшей

мере или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно $5,0 \times 10^7$, точно или приблизительно $1,5 \times 10^8$, точно или приблизительно $3,0 \times 10^8$, точно или приблизительно $4,5 \times 10^8$, точно или приблизительно $8,0 \times 10^8$ или точно или приблизительно $1,2 \times 10^9$ подвергнутых инженерии клеток, всех клеток, Т-клеток или РВМС. В определенных вариантах осуществления каждая стандартная доза содержит не более чем точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно $5,0 \times 10^7$, точно или приблизительно $1,5 \times 10^8$, точно или приблизительно $3,0 \times 10^8$, точно или приблизительно $4,5 \times 10^8$, точно или приблизительно $8,0 \times 10^8$ или точно или приблизительно $1,2 \times 10^9$ подвергнутых инженерии клеток, всех клеток, Т-клеток или РВМС. В определенных аспектах иллюстративная доза клеток, которая может содержаться во флаконах, содержит любые дозы, описываемые в настоящем документе, например, в разделе IV. В определенных аспектах иллюстративная доза клеток, которую можно вводить индивидууму, содержит любые дозы, описываемые в настоящем документе, например, в разделе IV.

[0671] В определенных вариантах осуществления объем формулируемой композиции клеток в каждом контейнере составляет от 10 мл до 100 мл, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или приблизительно 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл или 100 мл. В определенных вариантах осуществления клетки во флаконах можно подвергать криоконсервации. В определенных вариантах осуществления флаконы можно хранить в жидком азоте до дальнейшего применения.

[0672] В определенных вариантах осуществления такие клетки, полученные предоставляемым способом, или композицию, содержащую так клетки, вводят индивидууму для лечения заболевания или патологического состояния. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит средства или клетки в количествах, эффективных для лечения или предотвращения заболевания или патологического состояния, например, в терапевтически эффективном или профилактически эффективном количестве. В определенных вариантах осуществления терапевтическую или профилактическую эффективность контролируют посредством периодической оценки подвергаемых лечению индивидуумов. Для повторных введений в течение нескольких суток или более, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет требуемого подавления симптомов заболевания. Однако пригодными могут являться и их можно определить другие режимы дозирования. Требуемую дозу можно вводить посредством однократного болюсного введения композиции, посредством многократного болюсного введения композиции или посредством непрерывного инфузионного введения композиции.

[0673] Средства или клетки можно вводить любыми подходящими способами, например, посредством болюсной инфузии, посредством инъекции, например, внутривенной или подкожной инъекции, внутриглазной инъекции, периокулярной инъекции, субретинальной инъекции, интравитреальной инъекции, транссептальной инъекции, субсклеральной инъекции, интрахороидальной инъекции, интракамеральной

инъекции, субконъюнктивной инъекции, субконъюнктивной инъекции, субтеноновой инъекции, ретробульбарной инъекции, перibuльбарной инъекции или заднеоколосклеральной доставки. В определенных вариантах осуществления их вводят посредством парентерального, внутрилегочного и интраназального, а при необходимости местного лечения, посредством внутриочагового введения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, интраперитонеальное или подкожное введение. В определенных вариантах осуществления вводимую дозу вводят посредством однократного болюсного введения клеток или средства. В определенных вариантах осуществления ее вводят посредством нескольких болюсных введений клеток или средства, например, в течение периода не более 3 суток или посредством непрерывного инфузионного введения клеток или средства.

[0674] Для профилактики или лечения заболевания подходящая дозировка может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа средства или средств, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, вводят ли средство или клетки в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни индивидуума и ответа на средство или клетки, а также от решения лечащего врача. Композиции в определенных вариантах осуществления соответственно вводят индивидууму однократно или в течение серии процедур.

[0675] Клетки или средства можно вводить с использованием стандартных способов введения, составов и/или устройств. Предоставлены составы и устройства, такие как шприцы и флаконы, для хранения и введения композиций. В отношении клеток, введение может быть аутологичным или гетерологичным. Например, иммунореактивные клетки или предшественники можно получать, полученные у одного индивидуума и вводить тому же индивидууму или другому совместимому индивидууму. Иммунореактивные клетки периферической крови или их потомство (например, полученные *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*) можно вводить посредством местной инъекции, включая введение катетера, системную инъекцию, местную инъекцию, внутривенную инъекцию или парентеральное введение. Когда вводят терапевтическую композицию (например, фармацевтическую композицию, содержащую генетически модифицированную иммунореактивную клетку или средство, которое лечит или ослабляет симптомы нейротоксичности), ее, как правило, формулируют в форме (раствор, суспензия, эмульсия) инъектируемой единичной дозы.

[0676] Составы включают составы для перорального, внутривенного, интраперитонеального, подкожного, легочного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, буккального, сублингвального введения или введения в виде суппозитория. В определенных вариантах осуществления средство или популяции клеток вводят парентерально. Как используют в настоящем документе, термин "парентеральный", включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и интраперитонеальное введение. В определенных вариантах осуществления средство или популяции клеток вводят индивидууму с использованием периферической

системной доставки посредством внутривенной, интраперитонеальной или подкожной инъекции.

[0677] Композиции в определенных вариантах осуществления предоставлены в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые в определенных аспектах могут быть забуферены до выбранного pH. Жидкие препараты в норме получать легче, чем гели, друг вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции в определенной степени более удобны для введения, особенно посредством инъекции. С другой стороны, вязкие композиции, можно формулировать в пределах подходящего диапазона вязкости с обеспечением более длительного периода контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут представлять собой растворители или диспергирующие среды, содержащие, например, воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

[0678] Стерильные инъекционные растворы можно получать посредством введения средства или клеток в растворитель, например, в смеси с подходящим носителем, разбавителем или эксципиентом, таким как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза, декстроза или т.п.

[0679] Как правило, составы для использования при введении *in vivo*, являются стерильными. Стерильность можно легко обеспечить, например, посредством фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

1. Характеристики выходящей композиции

[0680] В числе предоставляемых вариантов осуществления находятся способы получения композиции клеток, содержащей подвергнутые генетической инженерии клетки, такой как выходящая композиция. В определенных аспектах выходящую композицию можно получать в результате генетической инженерии входящей композиции, например, любой, описываемой в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления способы, предоставляемые в настоящем документе, включают один или несколько этапов генетической инженерии клеток входящей композиции с получением выходящей композиции клеток, которая содержит подвергнутые инженерии клетки с конкретными свойствами, особенностями и/или характеристиками, такими как фенотипы клеток, например, присутствие и/или экспрессия поверхностного маркера и/или отсутствие или дефицит экспрессии поверхностного маркера у клеток композиции для введения. В определенных аспектах клетки в выходящей композиции включают клетки, которые экспрессируют, например, экспрессируют на поверхности клетки, или не экспрессируют один или несколько маркеров, ассоциированных с определенными фенотипами клеток, включающих маркеры, ассоциированные или указывающие на менее дифференцированный фенотип клеток, и/или маркеры, ассоциированные или указывающие на подтип клеток памяти. В определенных аспектах клетки в выходящей

композиции содержат клетки, которые продуцируют, например, в ответ на стимуляцию, как описано в настоящем документе, один или несколько цитокинов, включая цитокины, ассоциированные или указывающий на менее дифференцированный фенотип клеток, и/или цитокины, ассоциированные или указывающие на подтип клеток памяти. В определенных вариантах осуществления способы, предоставляемые в настоящем документе, приводят к получению выходящей композиции, пригодной для лечения заболевания. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция или состав, терапевтическая композиция или фармацевтическая композиция, формулируемые из нее, коррелируют с продолжительностью жизни без прогрессирования и/или длительным ответом. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция или состав, терапевтическая композиция или фармацевтическая композиция, формулируемые из нее, коррелируют с продолжительностью жизни без прогрессирования и/или длительным ответом у пациентов с высокой и/или низкой тяжестью заболевания так, как описано в настоящем документе.

[0681] В определенных вариантах осуществления способы, предоставляемые в настоящем документе, включают один или несколько этапов генетической инженерии клеток от старта и/или входящей композиции до получения конечной и/или выходящей композиции клеток с определенным отношением экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенным отношением рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

[0682] В определенных вариантах осуществления способы, предоставляемые в настоящем документе, включают один или несколько этапов генетической инженерии клеток от начала и/или входящей композиции до получения конечное и/или выходящей композиции клеток с определенным процентным содержанием клеток, например, CD4⁺-клеток, которые продуцируют IL-2, TNF-альфа или IFN-гамма.

[0683] В конкретных вариантах осуществления содержание, форма и/или состав входящей композиции коррелирует, контролирует, соответствует и/или ассоциировано с содержанием, формой и/или составом выходящей композиции клеток. В определенных вариантах осуществления количество, часть, процентное содержание, величина, количества на единицу объема, количества на единицу массы и/или отношение клеток, экспрессирующих один или несколько маркеров, ассоциированных с определенными фенотипами клеток, включая маркеры, ассоциированные или указывающие на менее дифференцированный фенотип клеток, и/или маркеры, ассоциированные или указывающие на подтип клеток памяти, во входящей композиции коррелирует, контролирует, соответствует и/или ассоциирован с содержанием, формой и/или составом

выходящей композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления количество, часть, значение, количества на единицу объема, количества на единицу массы и/или отношение $CD4^+$ Т-клеток и/или $CD8^+$ Т-клеток, экспрессирующих один или несколько маркеров, ассоциированных с определенными фенотипами клеток, включая маркеры, ассоциированные или указывающие на менее дифференцированный фенотип клеток, и/или маркеры, ассоциированные или указывающие на подтип клеток памяти, во входящей композиции коррелирует, контролирует, соответствует и/или ассоциирован с содержанием, формой и/или составом исходящей композиции клеток. В определенных аспектах экспрессия или отсутствие экспрессии одного или нескольких CCR7, CD27 и/или CD45RA клеток во входящей композиции коррелировано с экспрессией или отсутствием экспрессии одного или нескольких CCR7, CD27 и/или CD45RA клеток в исходящей композиции, например, после генетической инженерии для экспрессии рекомбинантного рецептора. Таким образом, в определенных аспектах количество, частота и/или процентное содержание клеток во входящей композиции, которые экспрессируют или не экспрессируют один или несколько CCR7, CD27 и/или CD45RA, ассоциировано, коррелирует и/или указывает на количество, частоту и/или процентное содержание экспрессирующих рекомбинантный рецептор подвергнутых инженерии клеток в исходящей композиции, которые экспрессируют или не экспрессируют один или несколько CCR7, CD27 и/или CD45RA. В определенных аспектах отсутствие экспрессии маркера апоптоза (например, активированной каспазы 3 или аннексина V) в клетках входящей композиции коррелирует с продолжительностью жизни без прогрессирования и/или длительным ответом после введения исходящей композиции (например, состава, терапевтической композиции, фармацевтической композиции, например вводимой в одной или нескольких стандартных дозах, как описано в настоящем документе). Таким образом, в определенных аспектах количество, частота и/или процентное содержание клеток во входящей композиции, которые не экспрессируют маркеров апоптоза (например, активированной каспазы 3, аннексина V) ассоциировано, коррелируют с исходящей композицией, пригодно для лечения заболевания.

[0684] В определенных аспектах исходящая композиция содержит определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/ $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

[0685] В определенных вариантах осуществления исходящая композиция содержит определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-, рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-, рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-,

рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ - и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток; или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит клетки, которые не экспрессируют маркеры апоптоза (например, каспазу 3, аннексин V).

[0686] В определенных вариантах осуществления определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток включает приблизительно 1:1 или приблизительно от 1:3 до 3:1 или приблизительно от 1:2 до 2:1 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-:рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-; рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-:рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-; рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-:рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-; рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻:рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-:рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток. В определенных вариантах осуществления определенное отношение клеток не включает клетки, которые экспрессируют маркеры апоптоза (например, каспазу 3, аннексин V).

[0687] В определенных вариантах осуществления определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции включает по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех клеток во входящей композиции или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех экспрессирующих рецептор клеток (рецептор⁺-клеток) в выходящей композиции, представляющих собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клетки и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клетки. В определенных вариантах осуществления определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺- и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺- и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции включает по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%,

60%, 70%, 80% или 90% всех клеток во входящей композиции или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех экспрессирующих рецептор клеток (рецептор⁺-клеток) в выходящей композиции, представляющих собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁻, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁻ и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁻ и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁻, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁻ и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁻-клетки.

[0688] В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% общего количества подвергнутых инженерии клеток (например, Т-клеток) в композиции или общего количества подвергнутых инженерии клеток (например, Т-клеток) в композиции, экспрессирующей рекомбинантный рецептор, негативный по маркерам апоптоза (например, каспаза-3, аннексин V). В определенных вариантах осуществления маркер апоптоза представляет собой активированную каспазу 3. В определенных вариантах осуществления маркер апоптоза представляет собой аннексин V.

[0689] В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит клетки, например, Т-клетки, такие как подвергнутые инженерии Т-клетки, способные к продукции одного или нескольких цитокинов, представляющих собой IL-2, IFN-гамма и/или TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит CD4⁺/CAR⁺-клетки, способные к продукции IL-2. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит CD4⁺/CAR⁺-клетки, способные к продукции TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит CD4⁺/CAR⁺-клетки, способные к продукции IL-2, TNF-альфа и IFN-гамма. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит CD4⁺/CAR⁺-клетки, способные к продукции IL-2 и TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит CD4⁺/CAR⁺-клетки, способные к продукции IL-2 и IFN-гамма. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит CD8⁺/CAR⁺-клетки, способные к продукции TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит CD8⁺/CAR⁺-клетки, способные к продукции TNF-альфа и IFN-гамма. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток, таких как подвергнутые инженерии CD4 Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор (например, CAR), способные к продукции цитокина, выбранного из интерлейкина 2 (IL-2) и/или TNF-альфа. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция содержит по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или более, общего количества CD4⁺ Т-клеток, таких как подвергнутые инженерии CD4 Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор (например, CAR), которые являются

полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа.

[0690] В конкретных вариантах осуществления способами, предоставляемыми в настоящем документе, продуцируют или получают композицию клеток, которая содержит подвергнутые генетической инженерии клетки, например, выходящую композицию клеток. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция клеток представляет собой композицию клеток, которая является результатом определенных или всех этапов генетической инженерии клеток. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция клеток является результатом процесса генетической инженерии клеток входящей композиции клеток. В определенных вариантах осуществления процесс включает один или несколько этапов активации, трансдукции или трансфекции, наращивания и/или сбора клеток, таких как клетки, которые получают из входящей композиции клеток. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция клеток содержит клетки, подвергнутые генетической инженерии. В конкретных вариантах осуществления клетки выходящей композиции клеток прошли все этапы процесса генетической инженерии.

[0691] В определенных вариантах осуществления выходящая композиция клеток содержит клетки, которые содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, вводимых посредством генетической инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантные или подвергнутые генетической инженерии продукты таких нуклеиновых кислот. В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е., в норме не присутствуют в клетке или образце, получаемом из клеток, например, такие которые получают из другого организма или клетки, которые например, как правило, не находятся в клетке, подвергаемой инженерии, и/или организме, из которого получают такие клетки. В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты не являются природными, например, нуклеиновая кислота не выявляемая в природе, включая кислоту, содержащую химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующую различные домены из нескольких различных типов клеток.

[0692] В определенных вариантах осуществления выходящая композиция клеток содержит клетки, подвергнутые генетической инженерии. В конкретных вариантах осуществления выходящая композиция клеток содержит подвергнутые инженерии Т-клетки. В определенных вариантах осуществления подвергнутые инженерии Т-клетки содержат подвергнутые инженерии $CD4^+$ Т-клетки и подвергнут инженерии $CD8^+$ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления выходящая композиция клеток содержит или включает по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 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% подвергнутых инженерии Т-клеток. В определенных вариантах осуществления подвергнутые инженерии клетки экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления выходящая композиция клеток содержит или включает по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 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% Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой TCR или CAR. В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой CAR.

[0693] В определенных аспектах способ дополнительно включает определение одной или несколько стандартных доз композиции Т-клеток для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, где стандартная доза содержит всю или часть выходящей композиции. В определенных аспектах всю или часть выходящей композиции можно использовать в качестве стандартной дозы для введения индивидууму. В определенных аспектах способы также включают отбор всей или части выходящей композиции, и необязательно комбинации с другим раствором с получением стандартной дозы композиции Т-клеток для введения. В определенных аспектах предоставляемые варианты осуществления включают определение одной или несколько стандартных доз композиции клеток и/или объема, соответствующего таким стандартным дозам, так, что стандартная доза может находиться в промышленном изделии, описываемом в настоящем документе, и/или ее можно вводить индивидууму, например, с терапевтическими целями. В определенных аспектах стандартная доза зависит от количества биологически активных подвергнутых инженерии Т-клеток с конкретным фенотипом, и/или, доза зависит от общего количества биологически активных подвергнутых инженерии Т-клеток с конкретным фенотипом. В определенных аспектах стандартная доза может представлять собой любую стандартную дозу, описываемую в настоящем документе, например, в разделе I. В определенных вариантах осуществления стандартная доза содержит всю или часть выходящей композиции, которая содержит: определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное

количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

[0694] В определенных вариантах осуществления выходящую композицию оценивают для определения фенотип(ов) (например, поверхностных маркеров, маркеров апоптоза, продукции цитокинов) клеток, содержащихся в выходящей композиции и процентного содержания таких фенотипов в выходящей композиции. В определенных вариантах осуществления выходящие композиции для терапевтического применения выбраны на основе одного или нескольких процентных содержаний клеток с конкретными представляющими интерес фенотипами. В определенных вариантах осуществления выходящая композиция, отобранная для применения в качестве терапевтического средства, содержит или включает один или несколько процентных содержаний клеток с конкретными фенотипами (например, поверхностными маркерами, маркерами апоптоза, продукцией цитокинов) в соответствии с одним или несколькими процентными содержаниями и фенотипами, описываемыми в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления, если выходящая композиция не включает один или несколько заданных процентных содержаний одного или нескольких фенотипов, например, процентного содержания конкретных фенотипов, описываем в настоящем документе, выходящую композицию можно подвергать процессу отбора для отбора, выделения или обогащения выходящей композиция так, чтобы достичь заданных процентных содержаний фенотипов. В определенных вариантах осуществления, если выходящую композицию нельзя подвергнуть дополнительной обработки с достижением требуемого процентного содержания одного или нескольких фенотипов, описываемых в настоящем документе, выходящую композицию в качестве терапевтической композиции не используют.

[0695] В определенных вариантах осуществления выходящую композицию подвергают криоконсервации любым из известных способов криоконсервации или как описано в настоящем документе.

III. ПОДВЕРГНУТЫЕ ИНЖЕНЕРИИ КЛЕТКИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ РЕКОМБИНАНТНЫЙ РЕЦЕПТОРЫ

[0696] В определенных вариантах осуществления предоставляемые способы и промышленные изделия относятся к подвергнутым инженерии клеткам, таким как иммунные клетки, такие как Т-клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор. В определенных аспектах предоставляемые способы включают введение подвергнутых инженерии Т-клеток, таких как $CD3^+$ Т-клетки, $CD4^+$ Т-клетки и/или $CD8^+$ Т-клетки, которые подвергают генетической инженерии для экспрессии рекомбинантного рецептора, например, химерного антигенного рецептора (CAR), включая введение композиции таких клеток, при котором вводят известное или определенное процентное содержание или количество клеток конкретного фенотипа, как описано в настоящем документе (например, $CCR7^+$ или $CD27$). В определенных аспектах рекомбинантные рецепторы подвергнутых инженерии клеток могут связывать и/или направлены к антигенам, ассоциированным с заболеванием или патологическим состоянием.

А. Рекомбинантные рецепторы

[0697] В число рецепторов входят антигенные рецепторы и рецепторы, содержащие один или несколько их компонентов. Рекомбинантные рецепторы могут включать химерные рецепторы, такие как рецепторы, содержащие лиганд-связывающие домены или их связывающие фрагменты и домены или области внутриклеточной сигнализации, функционально не являющиеся TCR антигенные рецепторы, химерные антигенные рецепторы (CARs) и Т-клеточные рецепторы (TCR), такие как рекомбинантные или трансгенные TCR, химерные рецепторы аутоантител (CAAR) и компоненты любых из указанных выше. Рекомбинантный рецептор, такой как CAR, как правило, включает внеклеточный антиген- (или лиганд-) связывающий домен, связанный с одним или несколькими компонентами внутриклеточной сигнализации, в определенных аспектах посредством линкеров и/или трансмембранного домена(ов).

1. Химерные антигенные рецепторы (CAR)

[0698] В определенных вариантах осуществления предоставлены подвергнутые инженерии клетки, такие как Т-клетки, которые экспрессируют CAR со специфичностью к конкретному антигену (или маркеру, или лиганду), такому как антиген, экспрессируемый на поверхности конкретного типа клеток. В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой полипептид. В определенных вариантах осуществления он представляет собой углевод или другую молекулу. В определенных вариантах осуществления антиген селективно экспрессирован или сверхэкспрессирован на клетках заболевания или патологического состояния, например, опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или не являющимися мишенями клетках или тканях. В других вариантах осуществления антиген экспрессирован на нормальных клетках и/или экспрессирован на подвергнутых инженерии клетках.

[0699] В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор, содержит область внутриклеточной сигнализации, которая содержит цитоплазматические сигнальные домен или область (также взаимозаменяемо называемые домен или область внутриклеточной сигнализации), такие как

цитоплазматическая (внутриклеточная) область, способная к индукции сигнала первичной активации в Т-клетке, например, цитоплазматические сигнальные домен или область компонента Т-клеточного рецептора (TCR) (например, цитоплазматические сигнальные домен или область зета-цепи цепи CD3-зета (CD3 ζ) или ее функционального варианта или сигнальной части), и/или которая содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

[0700] В определенных вариантах осуществления химерный рецептор дополнительно содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен, который специфически связывается с лигандом (например, антигеном). В определенных вариантах осуществления химерный рецептор представляет собой CAR, который содержит внеклеточный антиген-распознающий домен, который специфически связывается с антигеном. В определенных вариантах осуществления лиганд, такой как антиген, представляет собой белок, экспрессируемый на поверхности клеток. В определенных 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 контексте молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС).

[0701] Иллюстративные антигенные рецепторы, включающие CAR, и способы инженерии и введения таких рецепторов в клетки, включают способы, описанные, например, в публикациях международных патентных заявок №№ WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикациях патентных заявок США №№ US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США №№ 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353 и 8479118 и патентной заявки Европы № EP2537416, и/или способы, описанные в Sadelain et al., *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., *Cancer*, 2012 March 18(2): 160-75. В определенных аспектах антигенные рецепторы включают CAR, как описано в патенте США № 7446190, и CAR, описанные в публикации международной патентной заявки № WO/2014055668 A1. Примеры CAR включают CAR, как описано в любой из указанных выше публикаций, такой как WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патенте США № 7446190, патенте США № 8389282, Kochenderfer et al., 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; и Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177). Также см. WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патент США № 7446190 и патент США № 8389282.

[0702] В определенных вариантах осуществления CAR подвергают генетической инженерии с приданием специфичности к конкретному антигену (или маркеру, или лиганду), такому как антиген, экспрессируемый в конкретном типе клеток, для того, чтобы он служил мишенью при адоптивной терапии, например, маркеру злокачественной

опухоли и/или антигену, предназначенному для индукции реакции гашения, такому как антиген, экспрессируемый на нормальном или не пораженном заболеванием типе клеток. Таким образом, как правило, CAR содержит в его внеклеточной части одну или несколько антигенсвязывающих молекул, таких как один или несколько антигенсвязывающих фрагментов, доменов или частей, или один или несколько переменных доменов антител, и/или молекулы антител. В определенных вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающую часть или части молекул антител, такие как одноцепочечные фрагменты антител (scFv), получаемые из переменных фрагментов тяжелых (V_H) и переменных фрагментов легких (V_L) цепей моноклональных антител (mAb).

[0703] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть экспрессированы на клетках как часть рекомбинантного рецептора, такого как антигенный рецептор. В число антигенных рецепторов входят функциональные не являющиеся TCR антигенные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR). Как правило, CAR, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который демонстрирует TCR-подобную специфичность, направленный к комплексам пептид-МНС, также можно обозначить как TCR-подобный CAR. В определенных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобного CAR, специфичный к комплексу МНС-пептид, связан с одним или несколькими компонентами внутриклеточной сигнализации, в определенных аспектах посредством линкеров и/или трансмембранного домена(ов). В определенных вариантах осуществления такие молекулы, как правило, могут имитировать или соответствовать сигналу, передаваемому через природный антигенный рецептор, такой как TCR, и, необязательно, сигналу, передаваемому через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором.

[0704] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор (например, CAR), содержит лиганд-связывающий домен, который связывается, например, специфически связывается, с антигеном (или лигандом). В числе антигенов, являющихся мишенями химерных рецепторов, находятся антигены, экспрессируемые в условиях заболевания, патологического состояния или типом клеток, которые необходимо достичь посредством адоптивной клеточной терапии. В число заболеваний и патологических состояний входят пролиферативные, неопластические и злокачественные заболевания и нарушения, включая злокачественные опухоли и опухоли, включающие гематологические злокачественные опухоли, злокачественные опухоли иммунной системы, такие как лимфомы, лейкозы и/или миеломы, такие как В-, Т- и миелолейкозы, лимфомы и множественные миеломы.

[0705] В определенных вариантах осуществления антиген (или лиганд) представляет собой полипептид. В определенных вариантах осуществления он представляет собой углевод или другую молекулу. В определенных вариантах осуществления антиген (или лиганд) селективно экспрессирован или сверхэкспрессирован на клетках заболевания или патологического состояния, например, опухолевых или

патогенных клетках, по сравнению с нормальными или не являющимися мишенями клетками или тканями. В других вариантах осуществления антиген экспрессирован на нормальных клетках и/или экспрессирован на подвергнутых инженерии клетках.

[0706] В определенных вариантах осуществления CAR содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), которое специфически распознает антиген, такой как интактный антиген, экспрессируемый на поверхности клетки.

[0707] В определенных вариантах осуществления антиген (или лиганд) представляет собой опухолевый антиген или маркер злокачественной опухоли. В определенных вариантах осуществления антиген (или лиганд) антиген представляет собой или содержит интегрин $\alpha v \beta 6$ ($\alpha v \beta 6$ интегрин), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидраза 9 (CA9, также известный как CAIX или G250), раковотестикулярный антиген, антиген рака/семенников 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), раково-эмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, хемокиновый лиганд с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфатпротеогликан 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), мутацию рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин B2, рецептор эфрина A2 (EPHa2), рецептор эстрогенов, подобный Fc-рецептору белок 5 (FCRL5; также известный как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фетальный рецептор ацетилхолина (фетальн AchR), фолатсвязывающий белок (FBP), рецептор фолата альфа, ганглиозид GD2, О-ацетилированн GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), сопряженный с G-белком рецептор 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторную тирозинкиназу erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, высокомолекулярный ассоциированный с меланомой антиген человека (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита В, лейкоцитарный антиген человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарный антиген человека A2 (HLA-A2), рецептор IL-22 альфа (IL-22R α), рецептор IL-13 альфа 2 (IL-13R α 2), рецептор со встроенным киназным доменом (kdr), легкую цепь каппа, молекулу клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитоп CE7 L1-CAM, представитель А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антиген Льюиса Y, ассоциированный с меланомой антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), с-Met, цитомегаловирус мыши (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белок мелан А (MART-1), молекулу адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбриональный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, специфический антиген предстательной железы, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфический мембранный антиген предстательной железы (PSMA), орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивин, гликопротеин трофобласта (TPBG также известный как 5T4), опухоль-ассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), связанный с тирозинкиназой белок 1 (TRP1,

также известный как TYRP1 или gp75), связанный с тирозинкиназой белок 2 (TRP2, также известный как дофахромтаутомераза, дофахром-дельта-изомераза или DCT), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белок опухоли Вильмаса 1 (WT-1), специфичный для патогена или экспрессируемый на патогене антиген, или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены, к которым направлены рецепторы, в определенных вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любой из ряда известных В-клеточных маркеров. В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой или содержит CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

[0708] В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой или содержит специфичный для патогена или экспрессируемый на патогене антиген. В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой вирусный антиген (такой как вирусный антиген ВИЧ, HCV, HBV и т.д.), бактериальные антигены и/или паразитарные антигены.

[0709] Термин "антитело" в настоящем документе используют в самом широком смысле, и он включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая антигенсвязывающие (Fab) фрагменты, фрагменты F(ab')₂, фрагменты Fab', фрагменты Fv, фрагменты рекомбинантных IgG (rIgG), переменные области (V_H) тяжелых цепей, способные к специфическому связыванию антигена, одноцепочечные фрагменты антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFv) и фрагменты однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, нанотело). Термин включает подвергнутые генетической инженерии и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интраантитела, пептидные антитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, полиспецифичные, например, биспецифичные или триспецифичные, антитела, диантитела, триантитела и тетраантитела, tandemные ди-scFv, tandemные три-scFv. Если не указано иначе, термин "антитело" следует понимать, как включающий функциональные фрагменты антител, также обозначаемых в настоящем документе как "антигенсвязывающие фрагменты". Термин также включает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и их подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD.

[0710] Известно, что термины "определяющая комплементарность область" и "CDR", синонимичные с "гиперпеременной областью" или "HVR", в определенных случаях обозначают несмежные последовательности аминокислот в пределах переменных областей антител, которые обеспечивают антигенную специфичность и/или аффинность связывания. Как правило, существует три CDR в каждой переменной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой переменной

области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Известно, что "каркасные области" и "FR" в определенных случаях обозначают не являющиеся CDR части переменных областей тяжелых и легких цепей. Как правило, существуют четыре FR в каждой полноразмерной переменной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой полноразмерной переменной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4).

[0711] Точные границы аминокислотных последовательностей данных CDR или FR можно легко определять с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации "Kabat"); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации "Chothia"); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography", J. Mol. Biol. 262, 732-745". (схема нумерации "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 (схема нумерации "IMGT"); Honegger A and Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (схема нумерации "Aho"); и Martin et al., "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm", PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (схема нумерации "AbM").

[0712] Границы данных CDR или FR могут варьировать в зависимости от используемой для идентификации схемы. Например, схема Kabat основана на структурных выравниваниях, тогда как схема Chothia основана на структурной информации. Нумерация для схем Kabat и Chothia основана на наиболее частых длинах последовательностей областей антител, со вставками, описываемыми посредством вставки букв, например, "30a", и делециями, возникающими в определенных антитела. В двух схемах определенные инсерции и делеции ("индел") находятся в различных положениях, что приводит к различной нумерации. Схема Contact основана на анализе комплексных кристаллических структур и во многих отношениях сходна с системой нумерации Chothia. Схема AbM представляет собой компромисс между определениями Kabat и Chothia на основе того, что используют в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM.

[0713] В **таблице 1**, ниже, перечислены иллюстративные положения границ CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, идентифицированные в соответствии со схемами Kabat, Chothia, AbM и Contact, соответственно. Для CDR-H1, нумерация остатков приведена с использованием систем нумерации Kabat и Chothia. FR расположены между CDR, например, FR-L1 расположена перед CDR-L1, FR-L2 расположена между CDR-L1 и CDR-L2, FR-L3 расположена между CDR-L2 и CDR-L3 и т.д. Следует отметить, что так как приведенная система нумерации Kabat помещает вставки в H35A и H35B, конец петли CDR-H1 по Chothia при нумерации с использованием приведенной

нумерации по соглашению Kabat варьирует между H32 и H34, в зависимости от длины петли.

Таблица 1. Границы CDR в соответствии с различными системами 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

[0714] Таким образом, если не указано иначе, следует понимать, что "CDR" или "определяющая комплементарность область", или отдельные указанные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), данных антитела или его области, такой как его переменная область, включают (или указывают) определяющую комплементарность область, как определено по любой из указанных выше схем или по другим известным схемам. Например, когда указано, что конкретная CDR (например, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в данной аминокислотной последовательности V_H или V_L , следует понимать, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (например, CDR-H3) в пределах переменной области, как определено по любой из указанных выше схем или по другой из известных схем. В определенных вариантах осуществления указаны специфичные последовательности CDR. Иллюстративные последовательности CDR антител описаны с использованием различных систем нумерации, хотя следует понимать, что антитело может включать CDR, как описано в соответствии с любой другой из указанных выше систем нумерации или другими системами нумерации, известными специалисту в данной области.

[0715] Подобным образом, если не указано иначе, следует понимать, что FR или отдельные указанные FR (например, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4), данного антитела или его области, такой как его переменная область, включают (или указывают) каркасную область, как определено по любой из известных схем. В определенных случаях указана конкретная схема идентификации конкретных CDR, FR или FR или CDR, например CDR, как определено способом Kabat, Chothia, AbM или Contact или по другим известным

схемам. В других случаях приведена конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

[0716] Термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который вовлечен в связывание антитела с антигеном. Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L , соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, где каждый домен содержит 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)). Для определения специфичности связывания антигена может быть достаточно одного домена V_H или V_L . Кроме того, антитела, связывающие конкретный антиген, можно выделять с использованием домена V_H или V_L антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V_L или V_H , соответственно. См., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

[0717] В числе антител, включаемых в CAR, находятся фрагменты антител. "Фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител в качестве неограничивающих примеров включают F_v , Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; димеры; линейные антитела; вариабельные области (V_H) тяжелых цепей, молекулы одноцепочечных антител, такие как scFv и однодоменные антитела, содержащие только область V_H ; и полиспецифические антитела, формируемые из фрагментов антител. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен в CAR представляет собой или содержит фрагмент антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие вариабельную область (V_H) тяжелой цепи и/или вариабельную область (V_L) легкой цепи, такие как scFv.

[0718] В определенных вариантах осуществления антиген или антигенсвязывающий домен представляет собой CD19. В определенных вариантах осуществления scFv содержит V_H и V_L , получаемые из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD19. В определенных вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, который связывает CD19 представляет собой получаемое у мыши антитело, такое как FMC63 и SJ25C1. В определенных вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела представляет собой антитело человека, например, как описано в патентной публикации США № US 2016/0152723.

[0719] В определенных вариантах осуществления scFv получают из FMC63. Как правило, FMC63 относится к моноклональному антителу IgG1 мыши, индуцированному к клеткам Nalm-1 и -16, экспрессирующим CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., et al. (1987). *Leucocyte typing III*. 302). В определенных вариантах осуществления антитело FMC63 содержит CDR-H1 и CDR-H2, указанные в SEQ ID NO: 38 и 39, соответственно, и

CDR-H3, указанную в SEQ ID NO:40 или 54; и CDR-L1, указанную в SEQ ID NO:35 и CDR-L2, указанную в SEQ ID NO:36 или 55 и CDR-L3, указанную в SEQ ID NO:37 или 34. В определенных вариантах осуществления антитело FMC63 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42.

[0720] В определенных вариантах осуществления scFv содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR-L1 SEQ ID NO:35, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO:36 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO:37 и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR-H1 SEQ ID NO:38, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO:39, и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO:40. В определенных вариантах осуществления scFv содержит переменную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO:42. В определенных вариантах осуществления переменные области тяжелой и легкой цепей связаны линкером. В определенных вариантах осуществления линкер указан в SEQ ID NO:56. В определенных вариантах осуществления scFv содержит, в указанном порядке, V_H , линкер и V_L . В определенных вариантах осуществления scFv содержит, в указанном порядке, V_L , линкер и V_H . В определенных вариантах осуществления scFv кодирует последовательность нуклеотидов, указанная в SEQ ID NO:57 или последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:57. В определенных вариантах осуществления scFv содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:43 или последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:43.

[0721] В определенных вариантах осуществления scFv получают из SJ25C1. SJ25C1 представляет собой моноклональное антитело IgG1 мыши, индуцированное к клеткам Nalm-1 и -16, экспрессирующим CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., et al. (1987). Leucocyte typing III. 302). В определенных вариантах осуществления антитело SJ25C1 содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, указанные в SEQ ID NO: 47-49, соответственно, и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 последовательности, указанные в SEQ ID NO: 44-46, соответственно. В определенных вариантах осуществления антитело SJ25C1 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51.

[0722] В определенных вариантах осуществления scFv содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR-L1 SEQ ID NO:44, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO:45 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO:46, и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR-H1

SEQ ID NO:47, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO:48 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO:49. В определенных вариантах осуществления scFv содержит переменную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO:50,, и переменную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO:51., В определенных вариантах осуществления переменные области тяжелой и легкой цепей связаны линкером. В определенных вариантах осуществления линкер указан в SEQ ID NO:52. В определенных вариантах осуществления scFv содержит, в указанном порядке, V_H , линкер и V_L . В определенных вариантах осуществления scFv содержит, в указанном порядке, V_L , линкер и V_H . В определенных вариантах осуществления scFv содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:53, или последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:53.

[0723] В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой CD20. В определенных вариантах осуществления scFv содержит V_H и V_L , получаемые из антитела или фрагмента антитела, специфичных к CD20. В определенных вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, которые связывают CD20, представляют собой антитело, которое получают из ритуксимаба, например, из scFv ритуксимаба.

[0724] В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой CD22. В определенных вариантах осуществления scFv содержит V_H и V_L , получаемые из антитела или фрагмента антитела, специфичных к CD22. В определенных вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, которые связывают CD22, представляют собой антитело, которое получают из m971, например, из scFv m971.

[0725] В определенных вариантах осуществления антиген или антигенсвязывающий домен представляет собой BCMA. В определенных вариантах осуществления scFv содержит V_H и V_L , получаемые из антитела или фрагмента антитела, специфичных к BCMA. В определенных вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, которые связывают BCMA, представляют собой или содержат V_H и V_L из антитела или фрагмента антитела, указанного в публикациях международных патентных заявок №№ WO 2016/090327 и WO 2016/090320.

[0726] В определенных вариантах осуществления антиген или антигенсвязывающий домен представляют собой GPRC5D. В определенных вариантах осуществления scFv содержит V_H и V_L , получаемые из антитела или фрагмента антитела, специфичных к GPRC5D. В определенных вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, которые связывают GPRC5D, представляют собой или содержат V_H и V_L из антитела или фрагмента антитела, указанных в публикациях международных патентных заявок №№ WO 2016/090329 и WO 2016/090312.

[0727] В определенных вариантах осуществления CAR содержит TCR-подобное антитело, такое как антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), который специфически распознает внутриклеточный антиген, такой как опухолассоциированный антиген, представленный на клеточной поверхности в виде

комплекса МНС-пептид. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, которые распознают комплекс МНС-пептид, можно экспрессировать на клетках в качестве части рекомбинантного рецептора, такого как антигенный рецептор. В число антигенных рецепторов входят функциональные не являющиеся TCR антигенные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR). Как правило, CAR, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который демонстрирует TCR-подобную специфичность к комплексам пептид-МНС, также можно обозначать как TCR-подобный CAR.

[0728] Обозначение "главный комплекс гистосовместимости" (МНС) относится к белку, как правило гликопротеину, который содержит полиморфный участок связывания пептидов или связывающий желоб, который, в определенных случаях, может образовывать комплекс с пептидными антигенами полипептидов, включая пептидные антигены, процессируемые клеточными механизмами. В определенных случаях молекулы МНС могут быть представлены или экспрессированы на клеточной поверхности, включая варианты в виде комплекса с пептидом, т.е., комплекса МНС-пептид, для презентации антигена в конформации, распознаваемой антигенными рецепторами на Т-клетках, такими как TCR или TCR-подобное антитело. Как правило, молекулы МНС класса I представляют собой гетеродимеры с трансмембранной α -цепью, в определенных случаях с тремя α -доменами, и нековалентно ассоциированным $\beta 2$ микроглобулином. Как правило, молекулы МНС класса II состоят из двух трансмембранных гликопротеинов, α и β , которые, как правило, оба пронизывают мембрану. Молекула МНС может содержать эффективную часть МНС, которая содержит антигенсвязывающий участок или участки для связывания пептид и последовательностей, необходимых для распознавания соответствующим антигенным рецептором. В определенных вариантах осуществления молекулы МНС класса I доставляют пептиды, происходящие из цитозоля, на клеточную поверхность, где комплекс МНС-пептид распознают Т-клетки, как правило, такие как $CD8^+$ Т-клетки, но, в определенных случаях, $CD4^+$ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления молекулы МНС класса II доставляют пептиды, происходящие из везикулярной системы, на клеточную поверхность, где их, как правило, распознают $CD4^+$ Т-клетки. Как правило, молекулы МНС кодирует группа сцепленных локусов, совместно обозначаемых H-2 у мыши и лейкоцитарный антиген человека (HLA) у людей. Таким образом, как правило, МНС человека также можно обозначать как лейкоцитарный антиген человека (HLA).

[0729] Термин "комплекс МНС-пептид" или "комплекс пептид-МНС" или его вариации, относится к комплексу или ассоциации пептидного антигена и молекулы МНС, как правило, такой как нековалентные взаимодействия пептида в связывающем желобе или щели молекулы МНС. В определенных вариантах осуществления комплекс МНС-пептид представлен или отображен на поверхности клетки. В определенных вариантах осуществления комплекс МНС-пептид может специфически распознавать антигенный рецептор, такой как TCR, TCR-подобный CAR или их антигенсвязывающие части.

[0730] В определенных вариантах осуществления пептид, такой как пептидный антиген или эпитоп, полипептида может ассоциировать с молекулой МНС, например, для распознавания антигенным рецептором. Как правило, пептид происходит из более длинной биологической молекулы, такой как полипептид или белок, или основан на ее фрагменте. В определенных вариантах осуществления длина пептида, как правило, составляет приблизительно от 8 до приблизительно 24 аминокислот. В определенных вариантах осуществления длина пептида составляет от или приблизительно от 9 до 22 аминокислот для распознавания в комплексе с МНС класса II. В определенных вариантах осуществления длина пептида составляет от или приблизительно от 8 до 13 аминокислот для распознавания в комплексе с МНС класса I. В определенных вариантах осуществления после распознавания пептида в контексте молекулы МНС, таком как комплекс МНС-пептид, антигенный рецептор, такой как TCR или TCR-подобный CAR, продуцирует или инициирует активацию сигнала в Т-клетке, который индуцирует Т-клеточный ответ, такой как Т-клеточная пролиферация, продукция цитокинов, цитотоксический Т-клеточный ответ или другой ответ.

[0731] В определенных вариантах осуществления TCR-подобное антитело или его антигенсвязывающая часть известны или их можно получать известными способами (см. например, опубликованные заявки США №№ US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US20090226474; US20090304679 и международная публикация PCT № WO 03/068201).

[0732] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с комплексом МНС-пептид, можно получать посредством иммунизации хозяина эффективным количеством иммуногена, содержащего специфичный комплекс МНС-пептид. В определенных случаях пептид комплекса МНС-пептид представляет собой эпитоп антигена, способного к связыванию с МНС, такого как опухолевый антиген, например, универсальный опухолевый антиген, миеломный антиген или другой антиген, как описано ниже. В определенных вариантах осуществления хозяину затем вводят эффективное количество иммуногена для инициации иммунного ответа, где иммуноген сохраняет свою трехмерную форму в течение периода времени, достаточного для вызова иммунного ответа против трехмерного представления пептида в связывающем желобе молекулы МНС. Затем сыворотку, собранную у такого хозяина, анализируют для определения продукции желательных антител, распознающих трехмерное представление пептида в связывающем желобе молекулы МНС. В определенных вариантах осуществления продуцируемые антитела можно оценивать для подтверждения того, что антитело может различать комплекс МНС-пептид от отдельной молекулы МНС, отдельного представляющего интерес пептида и комплекса МНС и неспецифичного пептида. Затем можно выделять требуемые антитела.

[0733] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связываются с комплексом МНС-

пептид, можно получать способами презентации библиотеки антител, такой как фаговой библиотеки антител. В определенных вариантах осуществления можно получать библиотеки фагового дисплея мутантных Fab, scFv или других форм антител, например, в которых представители библиотеки мутированы по одному или нескольким остаткам CDR или CDR. См. например, опубликованные заявки США № US20020150914, US2014/0294841; и Cohen CJ. et al. (2003) *J Mol. Recogn.* 16:324-332.

[0734] Термин "антитело" в настоящем документе используют в самом широком смысле, и он включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая антигенсвязывающие (Fab) фрагменты, фрагменты F(ab')₂, фрагменты Fab', фрагменты Fv, фрагменты рекомбинантных IgG (rIgG), переменные области тяжелой цепи (V_H), способные к специфическому связыванию антигена, одноцепочечные фрагменты антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFv) и фрагменты однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, нанотело). Термин включает подвергнутые генетической инженерии и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интраантитела, пептидные антитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, полиспецифичные, например, биспецифические, антитела, диатела, триотела и тетратела, tandemные di-scFv, tandemные три-scFv. Если не указано иначе, термин "антитело" следует понимать, как включающий функциональные фрагменты антител. Термин также включает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и их подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD.

[0735] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты специфически распознают антиген полноразмерного антитела. В определенных вариантах осуществления тяжелые и легкие цепи антитела могут быть полноразмерными или могут представлять собой антигенсвязывающую часть (Fab, F(ab')₂, Fv или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv)). В других вариантах осуществления константная область тяжелой цепи антитела выбирают, например, из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE, в частности, выбирают, например, из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, более конкретно, IgG1 (например, IgG1 человека). В другом варианте осуществления константную область легкой цепи антитела выбирают, например, из каппа или лямбда, в частности, каппа.

[0736] В число предоставляемых антител входят фрагменты антител. "Фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител в качестве неограничивающих примеров включают Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; переменную область тяжелой цепи (V_H), молекулы одноцепочечных антител, такие как scFvs и однодоменные V_H антитела и полиспецифические антитела, формируемые из фрагментов антител. В конкретных вариантах осуществления антитела представляют собой

одноцепочечные фрагменты антител, содержащие переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи, такие как scFv.

[0737] Термин "переменная область" или "переменный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который вовлечен в связывание антитела с антигеном. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L , соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, где каждый домен, содержит 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)). Для обеспечения специфичности связывания антигена может быть достаточно одного домена V_H или V_L . Кроме того, антитела, которые связываются с конкретным антигеном, можно выделять с использованием домена V_H или V_L из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарным доменом V_L или V_H , соответственно. См., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

[0738] Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь или часть переменной области тяжелой цепи или весь или часть переменной области легкой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека. В определенных вариантах осуществления CAR содержит домен тяжелой цепи антитела, который специфически связывается с антигеном, таким как маркер злокачественной опухоли или антиген клеточной поверхности клетки или заболевания, подлежащих лечению, таких как опухолевая клетка или злокачественная клетка, таким как любой из заданных антигенов, описываемых в настоящем документе или уже известных.

[0739] Фрагменты антител можно получать различными способами, включая в качестве неограничивающих примеров протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продукцию рекомбинантными клетками-хозяевами. В определенных вариантах осуществления антитела представляют собой получаемые рекомбинантными способами фрагменты, такие как фрагменты, содержащие конфигурации, которые не встречаются в природе, такие как конфигурации с двумя или более областями или цепями антител, связанными синтетическими линкерами, например, пептидными линкерами, и/или которые нельзя получить посредством ферментативного расщепления природного интактного антитела. В определенных вариантах осуществления фрагменты антител представляют собой scFv.

[0740] "Гуманизованное" антитело представляет собой антитело, в котором все или по существу все аминокислотные остатки CDR получают из не принадлежащих человеку CDR, а все или по существу все аминокислотные остатки FR получают из FR человека. Гуманизованное антитело необязательно может включать по меньшей мере часть константной области антитела, получаемую из антитела человека. "Гуманизованная форма" не принадлежащего человеку антитела, относится к варианту не принадлежащего человеку антитела, которое подвергли гуманизации, как правило с целью уменьшения иммуногенности для людей, при сохранении специфичности и

аффинности исходного не принадлежащего человеку антитела. В определенных вариантах осуществления определенные остатки FR в гуманизированном антителе замещают соответствующими остатками не принадлежащего человеку антитела (например, антитела, из которого получают остатки CDR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

[0741] Таким образом, в определенных вариантах осуществления химерный антигенный рецептор, включающий TCR-подобные CAR, включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент антитела. В определенных вариантах осуществления антитело или фрагмент включает scFv. В определенных аспектах химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, и область внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации содержит домен внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции сигнала первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

[0742] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, такой как CAR, такой как его часть антитела, дополнительно включает спейсер, который может представлять собой или включает по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина или его вариант или модифицированную версию, такую как шарнирная область, например, шарнирная область IgG4, и/или C_H1/C_L и/или Fc-область. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор дополнительно содержит спейсер и/или шарнирную область. В определенных вариантах осуществления константная область или часть происходит из IgG человека, например, IgG4 или IgG1. В определенных аспектах часть константной области служит в качестве спейсерной области между антигенраспознающим компонентом, например, scFv, и трансмембранным доменом. Длина спейсера может быть такой, которая обеспечивает повышенную чувствительность клеток после связывания антигена, по сравнению с отсутствием спейсера. В определенных примерах длина спейсера составляет точно или приблизительно 12 аминокислот или не более чем 12 аминокислот. Иллюстративные спейсеры включают спейсеры с длиной по меньшей мере приблизительно от 10 до 229 аминокислот, приблизительно от 10 до 200 аминокислот, приблизительно от 10 до 175 аминокислот, приблизительно от 10 до 150 аминокислот, приблизительно от 10 до 125 аминокислот, приблизительно от 10 до 100 аминокислот, приблизительно от 10 до 75 аминокислот, приблизительно от 10 до 50 аминокислот, приблизительно от 10 до 40 аминокислот, приблизительно от 10 до 30 аминокислот, приблизительно от 10 до 20 аминокислот или приблизительно от 10 до 15 аминокислот, и включая любое целое число между конечных точек любых из перечисленных интервалов. В определенных вариантах осуществления спейсерная область содержит приблизительно 12 аминокислот или менее,

приблизительно 119 аминокислот или менее или приблизительно 229 аминокислот или менее. Иллюстративные спейсеры включают только шарнир IgG4, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и C_H3, или шарнир IgG4, связанный с доменом C_H3. Иллюстративные спейсеры в качестве неограничивающих примеров включают спейсеры, описанные в Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, Hudecek et al. (2015) Cancer Immunol Res. 3(2): 125-135 или в публикации международной патентной заявки № WO2014031687. В определенных вариантах осуществления спейсер содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:1 и кодируемую последовательностью, указанной в SEQ ID NO:2. В определенных вариантах осуществления спейсер содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:3. В определенных вариантах осуществления спейсер содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:4.

[0743] В определенных аспектах спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который (a) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина или его модифицированной версии или содержит приблизительно 15 аминокислот или менее, и не включает внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, (b) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно шарнира IgG4 или его модифицированной версии и/или содержит приблизительно 15 аминокислот или менее, и не включает внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, или (c) имеет длину, составляющую точно или приблизительно 12 аминокислот и/или содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно IgG4, или его модифицированной версии; или (d) состоит или содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 1, 3-5, 27-34 или 58, или вариант любых из указанных выше по меньшей мере с 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности их последовательностей с ними, или (e) содержит или состоит из формулы X₁PPX₂P, где X₁ представляет собой глицин, цистеин или аргинин, а X₂ представляет собой цистеин или треонин.

[0744] В определенных вариантах осуществления константная область или ее часть происходят из IgD. В определенных вариантах осуществления спейсер содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:5. В определенных вариантах осуществления спейсер содержит последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с последовательностью любого SEQ ID NO: 1, 3, 4 и 5.

[0745] Как правило, домен распознавания антигена связан с одним или несколькими компонентами внутриклеточной сигнализации, такими как компонентами передачи сигнала, которые имитируют активацию через комплекс антигенного рецептора, такой как комплекс TCR, в случае CAR, и/или сигнал через другие рецепторы клеточной поверхности. Таким образом, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий компонент (например, антитело) связан с одним или несколькими

трансмембранными областями и областями внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления трансмембранный домен слит с внеклеточным доменом. В одном из вариантов осуществления используют трансмембранный домен, который в природе ассоциирован с одним из доменов рецептора, например, CAR. В определенных случаях трансмембранный домен выбран или модифицирован посредством замены аминокислот во избежание связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или других поверхностных мембранных белков, чтобы минимизировать взаимодействия с другими представителями рецепторного комплекса.

[0746] Трансмембранный домен в определенных вариантах осуществления получают из природного или из синтетического источника. Когда источник является природным, домен в определенных аспектах получают из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, происходящие из (т.е. содержащие по меньшей мере трансмембранную область(и)) альфа-, бета- или зета-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 определенных вариантах осуществления является синтетическим. В определенных аспектах синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В определенных аспектах триплет из фенилаланина, триптофана и валина находится на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В определенных вариантах осуществления связь осуществляют посредством линкеров, спейсеров и/или трансмембранного домена(ов).

[0747] В число областей внутриклеточной сигнализации входят области, которые имитируют или похожи на сигнал, передаваемый через природный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором и/или сигнал только через костимулирующий рецептор. В определенных вариантах осуществления присутствует короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий остатки глицина и серина, например, дублет глицин-серин, и формирует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

[0748] Рецептор, например, CAR, как правило, включает по меньшей мере один компонент или компоненты внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления рецептор включает внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как цепь CD3 TCR, которая опосредует активацию Т-клеток и цитотоксичность, например, зета-цепь CD3. Таким образом, в определенных аспектах ROR1-связывающее антитело связано с одним или несколькими модулями клеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления модули клеточной сигнализации включают трансмембранный домен CD3, домены внутриклеточной сигнализации CD3 и/или другие трансмембранные домены CD. В определенных вариантах осуществления рецептор, например, CAR, дополнительно включает часть одной или нескольких дополнительных

молекул, таких как рецептор Fc γ , CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в определенных аспектах CAR включает химерную молекулу CD3-зета (CD3- ζ) или рецептора Fc γ и CD8, CD4, CD25 или CD16.

[0749] В определенных вариантах осуществления при связывании CAR, цитоплазматический домен или область внутриклеточной сигнализации CAR активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки, например, Т-клетки, подвергнутой инженерии с экспрессией CAR. Например, в определенных контекстах, CAR индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическая активность или Т-хелперная активность, такую как секреция цитокинов или других факторов. В определенных вариантах осуществления вместо интактной иммуностимулирующей цепи используют укороченную часть области внутриклеточной компонента сигнализации антигенного рецептора или костимулирующей молекулы, например, если она передает сигнал эффекторной функции. В определенных вариантах осуществления области внутриклеточной сигнализации, например, содержащие внутриклеточный домен или домены, включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), и в определенных аспектах также области корецепторов, которые в природе действуют во взаимодействии с таким рецептором с инициацией передачи сигнала после связывания антигенного рецептора с антигеном, и/или любое производное или вариант такой молекулы и/или любую синтетическую последовательностью, которая обладает такими же функциональными возможностями.

[0750] В контексте природного TCR, полная активация, как правило, требует не только передачи сигнала через TCR, но также и костимулирующего сигнала. Таким образом, в определенных вариантах осуществления для обеспечения полной активации в CAR также включен компонент для получения вторичного или костимулирующего сигнала. В других вариантах осуществления CAR не включает компонент для получения костимулирующего сигнала. В определенных аспектах в той же клетке экспрессирован дополнительный CAR и он обеспечивает компонент для получения вторичного или костимулирующего сигнала.

[0751] В определенных аспектах активация Т-клеток описана как опосредуемая двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: последовательностей, которые иницируют антиген-зависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и последовательностей, которые действуют независимым от антигена образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). В определенных аспектах CAR включает один или оба таких компонента передачи сигнала.

[0752] В определенных аспектах CAR содержит первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует первичную активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые

известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Примеры содержащих ITAM первичных цитоплазматических сигнальных последовательностей включают последовательности, получаемые из TCR или CD3-зета, FcR-гамма или FcR-бета. В определенных вариантах осуществления цитоплазматическая сигнальная молекула(ы) в CAR содержит(ат) цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, получаемую из CD3-зета.

[0753] В определенных вариантах осуществления CAR включает сигнальную область и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такого как CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 и ICOS. В определенных аспектах один и тот же CAR включает и сигнальную область, и костимулирующие компоненты.

[0754] В определенных вариантах осуществления сигнальная область включена в один CAR, тогда как костимулирующий компонент предоставлен другим CAR, распознающим другой антиген. В определенных вариантах осуществления CAR включают активирующие или стимулирующие CAR и костимулирующие CAR, которые все экспрессирует одна и та же клетка (см. WO2014/055668).

[0755] В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации содержит трансмембранный и сигнальный домены CD28, связанные с внутриклеточным доменом CD3 (например, CD3-зета). В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации содержит химерные костимулирующие домены CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9), связанные с внутриклеточным доменом CD3-зета.

[0756] В определенных вариантах осуществления CAR включает один или несколько, например, два или более, костимулирующих домена и активирующих домена, например, первичный активирующий домен, в цитоплазматической части. Иллюстративные CAR включают внутриклеточные компоненты CD3-зета, CD28 и 4-1BB.

[0757] В определенных случаях CAR обозначают как CAR первой, второй и/или третьей генерации. В определенных аспектах первая генерация CAR представляет собой CAR, который самостоятельно обеспечивает индуцируемый CD3-цепью сигнал при связывании антигена; в определенных аспектах CAR второй генерации представляет собой CAR, который обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, такой как CAR, содержащий домен внутриклеточной сигнализации из костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в определенных аспектах CAR третьей генерации в определенных аспектах представляет собой CAR, который содержит несколько костимулирующих домена различных костимулирующих рецепторов.

[0758] В определенных вариантах осуществления химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, описываемые в настоящем документе. В определенных аспектах химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, описываемые в настоящем документе, и домен внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления антитело или фрагмент включает scFv или однодоменное

антитело V_H и внутриклеточный домен содержит ITAM. В определенных аспектах домен внутриклеточной сигнализации включает сигнальный домен зета-цепи цепи CD3-зета (CD3 ζ). В определенных вариантах осуществления химерный антигенный рецептор включает трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации.

[0759] В определенных аспектах трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. Внеклеточный и трансмембранный домены могут быть связаны непосредственно или опосредовано. В определенных вариантах осуществления внеклеточный и трансмембранный домены связаны посредством спейсера, такого как любой, описываемый в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы Т-клетки, например, между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации. В определенных аспектах костимулирующая молекула Т-клетки представляет собой CD28 или 4-1BB.

[0760] В определенных вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и домен внутриклеточной сигнализации, содержащий сигнальную часть CD28 или ее функциональный вариант и сигнальную часть CD3-зета или ее функциональный вариант. В определенных вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и домен внутриклеточной сигнализации, содержащий сигнальную часть 4-1BB или ее функциональный вариант и сигнальную часть CD3-зета или ее функциональный вариант. В определенных таких вариантах осуществления рецептор дополнительно включает спейсер, содержащий часть молекулы Ig, такой как молекула Ig человек, такую как шарнир Ig, например, шарнир IgG4, такой как представляющий собой только шарнир спейсер.

[0761] В определенных вариантах осуществления трансмембранный домен рецептора, например, CAR представляет собой трансмембранный домен of CD28 человека или его вариант, например, 27-аминокислотный трансмембранный домен CD28 человека (номер доступа: P10747.1), или представляет собой трансмембранный домен, который содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с последовательностью SEQ ID NO:8; в определенных вариантах осуществления содержащая трансмембранный домен часть рекомбинантного рецептора содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:9, или последовательность аминокислот по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно с 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичностью последовательностей с ней.

[0762] В определенных вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы Т-клетки. В определенных аспектах костимулирующая молекула Т-клетки представляет собой CD28 или 4-1BB.

[0763] В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека или его функциональный вариант или часть, такие как его 41-аминокислотный домен и/или такой домен с заменой LL на GG в положениях 186-187 нативного белка CD28. В определенных вариантах осуществления домен внутриклеточной сигнализации может содержать последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:10 или 11 или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с последовательностью SEQ ID NO:10 или 11. В определенных вариантах осуществления внутриклеточная область содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB или его функциональный вариант или часть, такие как 42-аминокислотный цитоплазматический домен 4-1BB человека (номер доступа Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, такие как последовательность аминокислот, указанная в SEQ ID NO:12 или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с последовательностью SEQ ID NO:12.

[0764] В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации содержит цепь CD3 человека, необязательно стимулирующий сигнальный домен CD3-зета или его функциональный вариант, такой как 112-аминокислотный цитоплазматический домен изоформы 3 CD3 ζ человека (номер доступа: P20963.2) или сигнальный домен CD3-зета, как описано в патенте США № 7446190 или патенте США № 8911993. В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:13, 14 или 15 или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с последовательностями SEQ ID NO:13, 14 или 15.

[0765] В определенных аспектах спейсер содержит только шарнирную область IgG, такую как только шарнир IgG4 или IgG1, такую как содержащий только шарнир спейсер, указанный в SEQ ID NO:1. В других вариантах осуществления спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и/или C_H3. В определенных вариантах осуществления спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и C_H3, такой как указан в SEQ ID NO:3. В определенных вариантах осуществления спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный только с доменом C_H3, такой как указан в SEQ ID

NO:4. В определенных вариантах осуществления спейсер представляет собой или содержит богатую глицином последовательность или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры.

2. Т-клеточные рецепторы (TCR)

[0766] В определенных вариантах осуществления предоставлены подвергнутые инженерии клетки, такие как Т-клетки, которые экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающую часть, которые распознают пептидный эпитоп или Т-клеточный эпитоп заданного полипептида, такого как антиген опухоли, вирусный или аутоиммунный белок.

[0767] В определенных вариантах осуществления "Т-клеточный рецептор" или "TCR" представляет собой молекулу, которая содержит переменные цепи α и β (также известные как TCR α и TCR β , соответственно) или переменные цепи γ и δ (также известные как TCR α и TCR β , соответственно) или их антигенсвязывающие части, которые способны к специфическому связыванию с пептидом, связанным с молекулой МНС. В определенных вариантах осуществления TCR находится в форме $\alpha\beta$. Как правило, TCR, которые находятся в формах $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$, являются структурно сходными, но Т-клетки, экспрессирующие их могут иметь определенные анатомические участки нахождения или функции. TCR можно найти на поверхности клеток или в растворимой форме. Как правило, TCR находится на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он, как правило, отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС).

[0768] Если не указано иначе, термин "TCR" следует понимать, как включающий полноразмерные TCR, а также их антигенсвязывающие части или их антигенсвязывающие фрагменты. В определенных вариантах осуществления TCR представляет собой интактный или полноразмерный TCR, включающий TCR в форме $\alpha\beta$ или в форме $\gamma\delta$. В определенных вариантах осуществления TCR представляет собой антигенсвязывающую часть, которая является меньшей чем полноразмерный TCR, но которая связывается со специфичным пептидом, связанным с молекулой МНС, например, связывается с комплексом МНС-пептид. В определенных случаях антигенсвязывающая часть или фрагмент TCR может содержать только часть структурных доменов полноразмерного или интактного TCR, но все еще быть способным связывать пептидный эпитоп, такой как комплекс МНС-пептид, с которым связывается полноразмерный TCR. В определенных случаях антигенсвязывающая часть содержит переменные домены TCR, такие как переменная часть α -цепи и переменная часть β -цепи TCR, достаточные для формирования участка связывания для связывания со специфичным комплексом МНС-пептид. Как правило, переменные цепи TCR содержат определяющие комплементарность области, вовлеченные в распознавание пептида, МНС и/или комплекса МНС-пептид.

[0769] В определенных вариантах осуществления переменные домены TCR содержат гиперпеременные петли или определяющие комплементарность области

(CDR), которые, как правило, являются первичными участниками, вносящими вклад в распознавание антигена и в возможности и специфичности связывания. В определенных вариантах осуществления CDR TCR или их сочетание формирует весь или по существу весь антигенсвязывающий участок данной молекулы TCR. Различные CDR в пределах варибельной области цепи TCR, как правило, разделены каркасными областями (FR), которые, как правило, демонстрируют меньшую варибельность среди TCR молекул 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; также см. Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.* 27:55, 2003). В определенных вариантах осуществления CDR3 является основной CDR, отвечающей за связывание антигена или специфичность, или является наиболее важной среди трех CDR в данной варибельной области TCR для распознавания антигена, и/или для взаимодействия с частью процессированного пептида комплекса пептид-МНС. В определенных контекстах, CDR1 альфа-цепи может взаимодействовать с N-концевой частью определенных антигенных пептидов. В определенных контекстах, CDR1 бета-цепи может взаимодействовать с С-концевой частью пептида. В определенных контекстах, CDR2 вносит наиболее выраженный вклад или является первичной CDR, отвечающей за взаимодействие или распознавание части МНС комплекса МНС-пептид. В определенных вариантах осуществления варибельная область β -цепи может содержать дополнительную гиперварибельную область (CDR4 или HVR4), которая, как правило, вовлечена в связывание суперантигена, а не распознавание антигена (Kotb (1995) *Clinical Microbiology Reviews*, 8:411-426).

[0770] В определенных 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 определенных аспектах каждая цепь TCR может содержать один N-концевой иммуноглобулиновый варибельный домен, один константный иммуноглобулиновый домен, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост на С-конце. В определенных вариантах осуществления TCR ассоциирован с инвариантными белками комплекса CD3, вовлеченными в опосредование передачи сигнала.

[0771] В определенных вариантах осуществления TCR цепь содержит один или несколько константных доменов. Например, внеклеточная часть данной TCR цепи (например, α -цепи или β -цепи) может содержать два иммуноглобулиноподобных домена, таких как варибельный домен (например, $V\alpha$ или $V\beta$; как правило, аминокислоты 1-116 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 $C\alpha$, как правило, положения 117-259 цепи на основе нумерации по Kabat или константный домен β -цепи или $C\beta$, как правило, положения 117-295 цепи на основе Kabat), расположенные у клеточной мембраны. Например, в определенных случаях внеклеточная часть TCR,

формируемая двумя цепями, содержит два расположенных проксимально относительно мембраны константных домена и два расположенных дистально относительно мембраны переменных домена, где каждый из этих переменных доменов содержит CDR. Константный домен TCR может содержать короткие связывающие последовательности, в которых остаток цистеина формирует дисульфидную связь, таким образом, связывая две цепи TCR. В определенных вариантах осуществления TCR может содержать дополнительный остаток цистеина в каждой из α - и β -цепях так, что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

[0772] В определенных вариантах осуществления цепи TCR содержат трансмембранный домен. В определенных вариантах осуществления трансмембранный домен является положительно заряженным. В определенных случаях цепь TCR содержит цитоплазматический хвост. В определенных случаях структура позволяет TCR вступать в ассоциации с другими молекулами, такими как CD3 и его субъединицы. Например, TCR, содержащий константные домены с трансмембранной областью, может заякоривать белок в клеточной мембране и ассоциироваться с инвариантными субъединицами сигнального аппарата или комплекса CD3. Внутриклеточные хвосты сигнальных субъединиц CD3 (например, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 ζ цепи) содержат один или несколько иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов или ITAM, которые вовлечены в способность комплекса TCR к передаче сигнала.

[0773] В определенных вариантах осуществления TCR может представлять собой гетеродимер из двух цепей α и β (или необязательно γ и δ) или он может представлять собой одноцепочечную конструкцию TCR. В определенных вариантах осуществления TCR представляет собой гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (цепи α и β или цепи γ и δ), которые связаны, например, посредством дисульфидной связи или дисульфидных связей.

[0774] В определенных вариантах осуществления TCR можно получать из известной последовательности(ей) TCR, такой как последовательности цепей V α , β , для которых легкодоступной является по существу полноразмерная кодирующая последовательность. Способы получения полноразмерных последовательностей TCR, включая последовательности V-цепи, из клеточных источников хорошо известны. В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, можно получать из множества источников, например, амплификация кодирующих TCR нуклеиновых кислот посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) внутри или выделенной из данных клетки или клеток, или синтез общедоступных последовательностей ДНК TCR.

[0775] В определенных вариантах осуществления TCR получают из биологического источника, например, из клеток, например, из Т-клеток (например, цитотоксических Т-клеток), Т-клеточных гибридом или другого общедоступного источника. В определенных вариантах осуществления Т-клетки можно получать из выделенных *in vivo* клеток. В определенных вариантах осуществления TCR представляет

собой отобранный из тимуса TCR. В определенных вариантах осуществления TCR представляет собой рестрицированный по неоэпитопу TCR. В определенных вариантах осуществления Т-клетки могут представлять собой культивируемые Т-клеточные гибридомы или клоны. В определенных вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть или его антигенсвязывающий фрагмент можно получать синтетически из известных последовательностей TCR.

[0776] В определенных вариантах осуществления TCR получают из TCR, идентифицированного или отобранного на основе скрининга библиотеки TCR-кандидатов посредством заданного полипептидного антигена или его заданного Т-клеточного эпитопа. Библиотеки TCR можно получать посредством амплификации репертуара $V\alpha$ и $V\beta$ Т-клеток, выделенных у индивидуума, включая клетки, находящиеся в PBMC, селезенке или другом лимфоидном органе. В определенных случаях Т-клетки можно амплифицировать из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). В определенных вариантах осуществления библиотеки TCR можно получать из $CD4^+$ - или $CD8^+$ -клеток. В определенных вариантах осуществления TCR можно амплифицировать из источника Т-клеток нормального здорового индивидуума, т.е. библиотеки нормальных TCR. В определенных вариантах осуществления TCR можно амплифицировать из источника Т-клеток пораженного заболеванием индивидуума, т.е. библиотеки TCR пораженных заболеванием. В определенных вариантах осуществления используют вырожденные праймеры с амплификацией репертуар генов $V\alpha$ и $V\beta$, например посредством ОТ-ПЦР в образцах, таких как Т-клетки, полученные у людей. В определенных вариантах осуществления получать библиотеки scTv из библиотек наивных $V\alpha$ и $V\beta$, в которых продукты амплификации клонируют или собирают для разделения линкером. В зависимости от источника, индивидуума и клеток, библиотеки могут быть специфичными для аллелей HLA. Альтернативно, в определенных вариантах осуществления, библиотеки TCR можно получать посредством мутагенеза или диверсификации исходной или каркасной молекулы TCR. В определенных аспектах TCR подвергают направленной эволюции, например, посредством мутагенеза, например, α - или β -цепи. В определенных аспектах изменяют конкретные остатки в пределах CDR TCR. В определенных вариантах осуществления отобранные TCR можно модифицировать посредством созревания аффинности. В определенных вариантах осуществления антигенспецифичные Т-клетки можно выбирать, например, посредством скрининга, для оценки CTL активности против пептида. В определенных аспектах TCR, например, присутствующий на антигенспецифичных Т-клетках, можно выбирать, например, по активности связывания, например, конкретной аффинности или авидности к антигену.

[0777] В определенных вариантах осуществления подвергнутые генетической инженерии антигенные рецепторы включают рекомбинантные Т-клеточные рецепторы (TCR) и/или TCR, клонируемые из природных Т-клеток. В определенных вариантах осуществления идентифицируют высокоаффинный в отношении антигена-мишени (например, антигена злокачественной опухоли) Т-клеточный клон, выделяют его у

пациента и вносят в клетки. В определенных вариантах осуществления клон TCR к антигену-мишени получают у трансгенных, мышей подвергнутых инженерии генами иммунной системы человека (например, системой лейкоцитарного антигена человека или HLA). См., например, опухолевые антигены (см., например, Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15:169-180 and Cohen et al. (2005) J Immunol. 175:5799-5808. В определенных вариантах осуществления для выделения TCR к антигену-мишени используют фаговый дисплей (см., например, Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390-1395 and Li (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354.

[0778] В определенных вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть представляет собой молекулу, которую подвергают модификации или инженерии. В определенных вариантах осуществления для получения TCR с измененными свойствами, например, с повышенной аффинностью к конкретному комплексу МНС-пептид используют способы направленной эволюции. В определенных вариантах осуществления направленную эволюцию проводят посредством способов дисплея, включая в качестве неограничивающих примеров дрожжевой дисплей (Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 97, 5387-92), фаговый дисплей (Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54) или Т-клеточный дисплей (Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84). В определенных вариантах осуществления способы дисплея включают инженерию или модификацию известного, исходного или эталонного TCR. Например, в определенных случаях в качестве матрицы для получения мутантных TCR, у которых подвергнуты мутациям один или несколько остатков CDR, можно использовать TCR дикого типа и можно отбирать мутантов с измененным требуемым свойством, таким как более высокая аффинность к требуемому антигену-мишени.

[0779] В определенных вариантах осуществления пептиды заданного полипептида для применения в получении или продукции представляющего интерес TCR известны или их может легко идентифицировать специалист в данной области. В определенных вариантах осуществления пептиды, пригодные для использования в получении TCR или его антигенсвязывающих частях, можно определять на основе присутствия рестрицированного по HLA мотива в заданном представляющем интерес полипептиде, таком как заданный полипептид, описанный ниже. В определенных вариантах осуществления пептиды идентифицируют с использованием доступных компьютерных прогностических моделей. В определенных вариантах осуществления для прогноза участков связывания МНС класса I такие модели в качестве неограничивающих примеров включают ProPred1 (Singh and Raghava (2001) Bioinformatics 17(12):1236-1237), и SYFPEITHI (см. Schuler et al. (2007) Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, 409(1): 75-93 2007). В определенных вариантах осуществления рестрицированный по МНС эпитоп представляет собой HLA-A0201, который экспрессирован приблизительно у 39-46% всех европеоидов и, таким образом, представляет собой подходящий выбор

антигена МНС для применения в получении TCR или другой связывающей МНС-пептид молекулы.

[0780] С использованием компьютерных прогностических моделей известны мотивы связывания HLA-A0201 и участки расщепления для протеасом и иммунопротеасом. Для прогноза участков связывания МНС класса I такие модели в качестве неограничивающих примеров включают ProPred1 (более подробно описанную 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).

[0781] В определенных вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть могут представлять собой рекомбинантно продуцируемые природные белки или их мутантные формы, у которых изменены одно или несколько свойств, таких как характеристика связывания. В определенных вариантах осуществления TCR можно получать у одного из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса или другое млекопитающее. TCR может быть связан с клеткой или находиться в растворимой форме. В определенных вариантах осуществления для целей предоставляемых способов TCR находится в связанной с клеткой форме, экспрессируемой на поверхности клетки.

[0782] В определенных вариантах осуществления TCR представляет собой полноразмерный TCR. В определенных вариантах осуществления TCR представляет собой его антигенсвязывающую часть. В определенных вариантах осуществления TCR представляет собой димерный TCR (dTCR). В определенных вариантах осуществления TCR представляет собой одноцепочечный TCR (sc-TCR). В определенных вариантах осуществления dTCR или scTCR обладают структурами, как описано в WO 03/020763, WO 04/033685, WO2011/044186.

[0783] В определенных вариантах осуществления TCR содержит последовательность, соответствующую трансмембранной последовательности. В определенных вариантах осуществления TCR содержит последовательность соответствующую цитоплазматической последовательности. В определенных вариантах осуществления TCR способен к формированию комплекса TCR с CD3. В определенных вариантах осуществления любой из TCR, включая dTCR или scTCR, может быть связан с сигнальными доменами, что обеспечивает наличие активного TCR на поверхности Т-клетки. В определенных вариантах осуществления TCR экспрессирован на поверхности клеток.

[0784] В определенных вариантах осуществления dTCR содержит первый полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области α -цепи TCR слита с N-концом последовательности, соответствующей последовательности внеклеточной константной области α -цепи TCR, и второй полипептид, где последовательность соответствующая последовательности вариабельной

области β -цепи TCR слита с N-концом последовательности, соответствующей последовательности внеклеточной константной области β -цепи TCR, где первый и второй полипептиды связаны дисульфидной связью. В определенных вариантах осуществления связь может соответствовать природной межцепочечной дисульфидной связи, присутствующей в природных димерных TCR $\alpha\beta$. В определенных вариантах осуществления межцепочечные дисульфидные связи в природном TCR не присутствуют. Например, в определенных вариантах осуществления во внеклеточные последовательности константной области пары полипептидов dTCR можно встраивать один или несколько остатков цистеина. В определенных случаях необходимыми могут являться и природная, и неприродная дисульфидные связи. В определенных вариантах осуществления TCR содержит трансмембранную последовательность для закоривания в мембране.

[0785] В определенных вариантах осуществления dTCR содержит α -цепь TCR, содержащую переменный домен α -цепи, константный домен α -цепи и первый мотив димеризации, связанный с C-концом константного домена α -цепи, и β -цепь TCR, содержащую переменный домен β -цепи, константный домен β -цепи и первый мотив димеризации, связанный с C-концом константного домена β -цепи, где первый и второй мотивы димеризации легко взаимодействуют с формированием ковалентной связи между аминокислотой в первом мотиве димеризации и аминокислотой во втором мотиве димеризации, что связывает α -цепь TCR и β -цепь TCR друг с другом.

[0786] В определенных вариантах осуществления TCR представляет собой scTCR. Как правило, scTCR можно получать известными способами. 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 публикации PCT №№ WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; и Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). В определенных вариантах осуществления scTCR содержит введенную неприродную дисульфидную межцепочечную связь для облегчения ассоциации цепей TCR (см. например, международную публикацию PCT № WO 03/020763). В определенных вариантах осуществления scTCR представляет собой связанный не являющимися дисульфидными связями укороченный TCR, в котором ассоциацию цепей облегчают гетерологичные лейциновые застёжки, слитые с их C-концами (см. например, международную публикацию PCT № WO99/60120). В определенных вариантах осуществления scTCR содержит переменный домен TCR α , ковалентно связанный с переменным доменом TCR β посредством пептидного линкера (см. например, международную публикацию PCT № WO99/18129).

[0787] В определенных вариантах осуществления scTCR содержит первый участок, образованный аминокислотной последовательностью, соответствующей переменной области α -цепи TCR, второй участок, образованный аминокислотной последовательностью, соответствующей переменной области β -цепи TCR, слитый с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей

последовательности константного внеклеточного домена β -цепи TCR, и линкерную последовательность связывающую С-конец первого участка с N-концом второго участка.

[0788] В определенных вариантах осуществления scTCR содержит первый участок, образованный последовательностью вариабельной области α -цепи, слитой с N-концом последовательности внеклеточного константного домена α -цепи, и второй участок, образованный последовательностью вариабельной области β -цепи, слитой с N-концом последовательности константного и трансмембранного доменов β -цепи, и, необязательно, последовательность линкера, связывающую С-конец первого участка с N-концом второго участка.

[0789] В определенных вариантах осуществления scTCR содержит первый участок, образованный последовательностью вариабельной области β -цепи TCR, слитой с N-концом последовательности внеклеточного константного домена β -цепи, и второй участок, образованный последовательностью вариабельной области α -цепи, слитой с N-концом последовательности константного и трансмембранного доменов α -цепи, и, необязательно, последовательность линкера, связывающую С-конец первого участка с N-концом второго участка.

[0790] В определенных вариантах осуществления линкер scTCR, который связывает первый и второй участки TCR может представлять собой любой линкер, способный к формированию единой полипептидной цепи, при сохранении специфичности связывания TCR. В определенных вариантах осуществления последовательность линкера может иметь формулу, например, -P-AA-P-, где P представляет собой пролин и AA представляет аминокислотную последовательность, где аминокислоты представляют собой глицин и серин. В определенных вариантах осуществления первый и второй участки спарены так, что последовательности их вариабельных областей ориентированы для такого связывания. Таким образом, в определенных случаях линкер обладает достаточной длиной для формирования расстояния между С-концом первого участка и N-концом второго участка, или наоборот, но является недостаточно длинным для блокировки или уменьшения связывания scTCR с заданным лигандом. В определенных 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 аминокислот. В определенных 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 определенных вариантах осуществления линкер имеет последовательность GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO:23)

[0791] В определенных вариантах осуществления scTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, связывающую остаток области иммуноглобулина константного домена α -цепи с остатком области иммуноглобулина константного домена β -цепи. В определенных вариантах осуществления межцепочечная дисульфидная связь в природном TCR не представлена. Например, в определенных вариантах осуществления один или

несколько остатков цистеина можно встраивать в последовательности внеклеточной константной области первого и второго участков полипептида scTCR. В определенных случаях могут быть необходимы и природная, и неприродная дисульфидные связи.

[0792] В определенных вариантах осуществления dTCR или scTCR, содержащих внесенные межцепочечные дисульфидные связи, природные дисульфидные связи не присутствуют. В определенных вариантах осуществления один или несколько природных остатков цистеина, формирующих природные межцепочечные дисульфидные связи, замещают другим остатком, таким как серин или аланин. В определенных вариантах осуществления вносимую дисульфидную связь можно формировать посредством мутации не являющегося цистеином остатка на первом и втором участках в цистеин. Иллюстративные неприродные дисульфидные связи TCR описаны в международной публикации PCT № WO2006/000830.

[0793] В определенных вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует аффинность с равновесной константой связывания с антигеном-мишенью от или приблизительно от 10^{-5} до 10^{-12} М и все отдельные значения и диапазоны в них. В определенных вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой комплекс МНС-пептид или лиганд.

[0794] В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, например, α - и β -цепи, можно амплифицировать посредством ПЦР, клонирования или другими подходящими способами и клонировать в подходящие экспрессирующий вектор или векторы. Экспрессирующий вектор может представлять собой любой подходящий рекомбинантный экспрессирующий вектор, и его можно использовать для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Подходящие векторы включают векторы, предназначенные для размножения и роста или для экспрессии или того и другого, например, плазмиды и вирусы.

[0795] В определенных вариантах осуществления вектор может представлять собой вектор серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), серии pET (Novagen, Madison, Wis.), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) или серии pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). В определенных случаях также можно использовать бактериофаговые векторы, такие как λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 и λ NM1149. В определенных вариантах осуществления можно использовать экспрессирующие векторы растений, и они включают pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В определенных вариантах осуществления экспрессирующие векторы животных включают pEUK-C1, pMAM и pMAMneo (Clontech). В определенных вариантах осуществления используют вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор.

[0796] В определенных вариантах осуществления рекомбинантные экспрессирующие векторы можно получать с использованием стандартных технологий рекомбинантных ДНК. В определенных вариантах осуществления векторы могут содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации транскрипции и трансляции и кодоны терминации, которые специфичны для типа хозяина (например,

бактерии, гриба, растения или животного) которому вводят вектор, как необходимо и принимая во внимание является ли вектор ДНК- или РНК-содержащим. В определенных вариантах осуществления вектор может содержать ненативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей TCR или его антигенсвязывающую часть (или другую связывающую МНС-пептид молекулу). В определенных вариантах осуществления промотор может являться невирусным промотором или вирусным промотором, таким как цитомегаловирусный (CMV) промотор, промотор SV40, промотор RSV и промотор, найденный в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мыши. Предусмотрены также другие известные промоторы.

[0797] В определенных вариантах осуществления после получения Т-клеточного клона, выделяют альфа- и бета-цепи TCR и клонируют в вектор для экспрессии гена. В определенных вариантах осуществления гены альфа- и бета-цепей TCR связаны посредством пептидом проскока рибосомы 2А пикорнавируса так, что обе цепи экспрессируются совместно. В определенных вариантах осуществления генетический перенос TCR проводят посредством ретровирусных или лентивирусных векторов или посредством транспозонов (см., например, Baum et al. (2006) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 13:1050-1063; Frecha et al. (2010) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 18:1748-1757; и Hackett et al. (2010) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 18:674-683).

[0798] В определенных вариантах осуществления для получения вектора, кодирующего TCR, α - и β -цепи подвергают амплификации посредством ПЦР из тотальной кДНК, выделенной из Т-клеточного клона, экспрессирующего представляющий интерес TCR, и клонируют в экспрессирующий вектор. В определенных вариантах осуществления α - и β -цепи клонируют в один и тот же вектор. В определенных вариантах осуществления α - и β -цепи клонируют в различные векторы. В определенных вариантах осуществления получаемые α - и β -цепи встраивают в ретровирусный, например, лентивирусный, вектор.

3. Химерный рецептор аутоантител (CAAR)

[0799] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор аутоантител (CAAR). В определенных вариантах осуществления CAAR специфичен к аутоантителу. В определенных вариантах осуществления клетку, экспрессирующую CAAR, такую как Т-клетка, подвергнутая инженерии с экспрессией CAAR, можно использовать для специфического связывания и уничтожения экспрессирующих аутоантитела клеток, но не экспрессирующих нормальные антитела клеток. В определенных вариантах осуществления экспрессирующие CAAR клетки можно использовать для лечения аутоиммунного заболевания, ассоциированного с экспрессией собственных антигенов, таких как аутоиммунные заболевания. В определенных вариантах осуществления экспрессирующие CAAR клетки могут быть специфичны к В-клеткам, которые в конечном итоге продуцируют аутоантитела и экспонируют аутоантитела на своих клеточных поверхностях, что маркирует эти В-клетки как специфичные для заболевания мишени для

терапевтического вмешательства. В определенных вариантах осуществления экспрессирующие CAAR клетки можно использовать для эффективного достижения и уничтожения патогенных В-клеток при аутоиммунных заболеваниях посредством направленного воздействия с вызывающими заболевание В-клетками с использованием антигенспецифичного химерного рецептора аутоантител. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой CAAR, такой как любой из описанных в публикации патентной заявки США № US 2017/0051035.

[0800] В определенных вариантах осуществления CAAR содержит связывающий аутоантитело домен, трансмембранный домен и область внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации содержит домен внутриклеточной сигнализации. В определенных вариантах осуществления домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции сигнала первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR), и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В определенных вариантах осуществления область внутриклеточной сигнализации содержит вторичную или костимулирующую сигнальную область (вторичные области внутриклеточной сигнализации).

[0801] В определенных вариантах осуществления связывающий аутоантитело домен содержит аутоантиген или его фрагмент. Выбор аутоантигена может зависеть от типа аутоантитела-мишени. Например, аутоантиген можно выбирать по той причине, что он распознает аутоантитело на клетке-мишени, такой как В-клетка, ассоциированная с конкретным заболеванием, например, аутоиммунным заболеванием, таким как опосредуемое аутоантителами аутоиммунное заболевание. В определенных вариантах осуществления аутоиммунное заболевание включает обыкновенную пузырчатку (PV). Иллюстративные аутоантигены включают десмоглеин 1 (Dsg1) и Dsg3.

4. Множественная направленность

[0802] В определенных вариантах осуществления клетки и способы включают стратегии множественной направленности, такие как экспрессия на клетке двух или более генетически сконструированных рецепторов, каждый из которых распознает один и тот же или разные антигены и, как правило, каждый из них содержит разные компоненты внутриклеточной сигнализации. Такие стратегии множественной направленности описаны, например, в публикации международной патентной заявки № WO 2014055668 A1 (где описаны комбинации активирующих и костимулирующих CAR, например, направленных на два различных антигена, представленных отдельно на не являющихся мишенями, например, нормальных клетках, но представленные вместе только на клетках заболевания или патологического состояния, подлежащего лечению) и в Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (December, 2013) (где описаны клетки, экспрессирующие активирующие и ингибирующие CAR, такие как клетки, в которых активирующий CAR связывается с одним антигеном, экспрессируемым на нормальных или не пораженных

заболеванием клеток и клетках заболевания или патологического состояния, подлежащего лечению, а ингибирующий CAR связывается с другим антигеном, экспрессируемым только на нормальных клетках или клетках, на которые не требуется делать мишенью).

[0803] Например, в определенных вариантах осуществления клетки содержат рецептор, экспрессирующий первый подвергнут генетической инженерии антигенный рецептор (например, CAR или TCR), который способен к индукции активирующего или стимулирующего сигнала в клетке, как правило после специфического связывания с антигеном, распознаваемым первым рецептором, например, первым антигеном. В определенных вариантах осуществления клетка дополнительно содержит второй подвергнутый генетической инженерии антигенный рецептор (например, CAR или TCR), например, химерный костимулирующий рецептор, который способен к индукции в иммунной клетке костимулирующего сигнала, как правило, после специфического связывания со вторым антигеном, распознаваемым вторым рецептором. В определенных вариантах осуществления первый антиген и второй антиген являются одинаковыми. В определенных вариантах осуществления первый антиген и второй антиген являются различными.

[0804] В определенных вариантах осуществления первый и/или второй подвергнутый генетической инженерии антигенный рецептор (например, CAR или TCR) способны к индукции в клетке активирующего или стимулирующего сигнала. В определенных вариантах осуществления рецептор содержит компонент внутриклеточной сигнализации, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы. В определенных вариантах осуществления активация, индуцированная первым рецептором включает передачу сигнала или изменение экспрессии белка в клетке, что приводит к началу иммунного ответа, например фосфорилированию ITAM и/или старту опосредуемого ITAM каскада передачи сигнала, формированию иммунологического синапса и/или кластеризации молекул рядом со связанным рецептором (например, CD4 или CD8 и т.д.), активации одного или нескольких факторов транскрипции, таких как NF-κB и/или AP-1 и/или индукции экспрессии генов факторов, таких как цитокины, пролиферации и/или жизнеспособности.

[0805] В определенных вариантах осуществления первый и/или второй рецепторы содержат домены внутриклеточной сигнализации костимулирующих рецепторов, таких как CD28, CD137 (4-1BB), OX40 и/или ICOS. В определенных вариантах осуществления первый и второй рецептор содержат домены внутриклеточной сигнализации костимулирующего рецептора, которые являются различными. В одном из вариантов осуществления первый рецептор содержит костимулирующую сигнальную область CD28, а второй рецептор содержит костимулирующую сигнальную область 4-1BB или наоборот.

[0806] В определенных вариантах осуществления первый и/или второй рецепторы содержат домен внутриклеточной сигнализации, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы и домен внутриклеточной сигнализации костимулирующего рецептора.

[0807] В определенных вариантах осуществления первый рецептор содержит домен внутриклеточной сигнализации, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы, а второй рецептор содержит домен внутриклеточной сигнализации костимулирующего рецептора. Костимулирующий сигнал в комбинации с активирующим или стимулирующим сигналами, индуцированными в той же клетке, представляют собой то, что приводит к иммунному ответу, такому как сильный и длительный иммунный ответ, такой как увеличенная экспрессия генов, секреция цитокинов и других факторов и опосредуемые Т-клетками эффекторные функции, такие как уничтожение клеток.

[0808] В определенных вариантах осуществления ни отдельное связывание первого рецептора, ни отдельное связывание второго рецептора не индуцирует сильный иммунный ответ. В определенных аспектах, если связан только один рецептор, клетка становится толерантной или не реагирующей на антиген, или у нее происходит ингибирование и/или не происходит индукции пролиферации или секреции факторов или выполнения эффекторных функций. Однако в таких определенных вариантах осуществления, когда связано множество рецепторов, например, при встрече с клетками, экспрессирующими первый и второй антигены, происходит требуемый ответ, такой как полная иммунная активация или стимуляция, например, на что указывает секреция одного или нескольких цитокинов, пролиферация, продолжительность жизни и/или осуществление иммунной эффекторной функции, такой как цитотоксическое уничтожение клеток-мишеней.

[0809] В определенных вариантах осуществления два рецептора индуцируют в клетке, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал так, что связывание одного из рецепторов с его антигеном активирует клетку или индуцирует ответ, а связывание второго ингибирующего рецептора с его антигеном индуцирует сигнал, который подавляет или ослабляет этот ответ. Примеры представляют собой комбинации активирующих CAR и ингибирующих CAR или iCAR. Такую стратегию можно использовать, например, когда активирующий CAR связывает антиген, экспрессируемый при заболевании или патологическом состоянии, но который также экспрессирован на нормальных клетках, а ингибирующий рецептор связывается с другим антигеном, который экспрессирован на нормальных клетках, но не на клетках заболевания или патологического состояния.

[0810] В определенных вариантах осуществления клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор дополнительно содержат ингибирующие CAR (iCAR, см. Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (2013), такие как CAR, распознающие антиген, отличный от антигена, ассоциированного и/или специфичного к заболеванию или патологическому состоянию, при этом активирующий сигнал, доставляемый посредством направленного на заболевание CAR, снижается или ингибируется посредством связывания ингибирующего CAR с его лигандом, например, с уменьшением побочных эффектов.

[0811] В определенных вариантах осуществления два рецептора индуцируют в клетке, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал так, что связывание

одного из рецепторов с его антигеном активирует клетку или индуцирует ответ, а связывание второго ингибирующего рецептора с его антигеном индуцирует сигнал, который подавляет или ослабляет этот ответ. Примерами являются комбинации активирующих CAR и ингибирующих CAR (iCAR). Такую стратегию можно использовать, например, для уменьшения вероятности побочных эффектов в контексте, где активирующие CAR связывают антиген, экспрессируемый при заболевании или патологическом состоянии, но который также экспрессирован на нормальных клетках, а ингибирующий рецептор связывается с другим антигеном, который экспрессирован на нормальных клетках, но не на клетках заболевания или патологического состояния.

[0812] В определенных аспектах химерный рецептор представляет собой или содержит ингибирующий CAR (например, iCAR) и содержит внутриклеточные компоненты, которые ослабляют или подавляют иммунный ответ, например, стимулируемый ITAM и/или костимулирующим компонентом ответ в клетке. Примерами таких компонентов внутриклеточной сигнализации являются компоненты, находящиеся на молекулах контрольной точки иммунного ответа, включающих PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, рецепторы PGE2, аденозиновые рецепторы EP2/4, включая A2AR. В определенных аспектах подвергнутая инженерии клетка содержит ингибирующий CAR, содержащий сигнальный домен, или получаемый из такой ингибирующей молекулы так, что он служит для ослабления ответа клетки, например, клетки которая индуцирована посредством активирующего и/или костимулирующего CAR.

[0813] В определенных вариантах осуществления стратегию множественной направленности используют в случае, когда антиген, ассоциированный с конкретным заболеванием или патологическим состоянием, экспрессирован на не пораженной заболеванием клетке и/или экспрессирован на самой подвергнутой инженерии клетка, транзиторно (например, после стимуляции в связи с генетической инженерией) или постоянно. В таких случаях, вследствие необходимости связывания двух отдельных и независимо специфичных антигенных рецепторов можно улучшить специфичность, селективность и/или эффективность.

[0814] В определенных вариантах осуществления множество антигенов, например, первый и второй антигены, экспрессированы на клетке, в ткани или при заболевании или патологическом состоянии, подлежащем лечению, например, на злокачественной клетке. В определенных аспектах клетка, ткань, заболевание или патологическое состояние представляет собой множественную миелому или клетку множественной миеломы. В определенных вариантах осуществления один или несколько из множества антигенов, как правило, также экспрессированы на клетке, которую не требуется делать мишенью клеточной терапии, на такой как нормальная или не пораженная заболеванием клетка или ткань, и/или сами подвергнутые инженерии клетки. В таких вариантах осуществления вследствие необходимости связывания нескольких рецепторов для достижения ответа клетки можно улучшить специфичность, селективность и/или эффективность.

IV. ПРОМЫШЛЕННЫЕ ИЗДЕЛИЯ И НАБОРЫ

[0815] Также предоставлены промышленные изделия, так как наборы и устройства, для введения клеток индивидуумам предоставляемыми способами адоптивной клеточной терапии и для хранения и введение клеток и композиций.

[0816] Промышленные изделия содержат один или несколько контейнеров, как правило, множество контейнеров, упаковочный материал и ярлык или вкладыш в упаковку на или в ассоциации с контейнером или контейнерами и/или упаковкой, как правило, содержащие инструкции для введения клеток индивидууму.

[0817] В определенных вариантах осуществления предоставлены промышленные изделия и/или наборы, которые содержат композицию, содержащую терапевтически эффективное количество любых подвергнутых инженерии клеток, описываемых в настоящем документе, и инструкции для введения индивидууму для лечения заболевания или патологического состояния. В определенных вариантах осуществления инструкции могут указывать определенные или все элементы способов, предоставляемых в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления инструкции определяют конкретные инструкции для введения клеток для клеточной терапии, например, дозы, сроки, отбор и/или идентификацию индивидуумов для введения и патологические состояния для введения. В определенных вариантах осуществления инструкции можно включать в виде ярлыка или вкладыш в упаковку, сопровождающих композиции для введения. В определенных вариантах осуществления в инструкциях указано определение доз композиции для введения, например, одной или нескольких ее стандартных доз и/или объема, соответствующего таким одной или нескольким стандартным дозам

[0818] Контейнеры, как правило, содержат клетки для введения, например, одну или несколько их стандартных доз. Промышленное изделие, как правило, содержит множество контейнеров, где каждый содержит одну стандартную дозу клеток. Стандартная доза может представлять собой количество клеток для введения индивидууму в первой дозе или двойное количество (или более) клеток для введения в первой или любой одной или нескольких последующих дозах. Она может представлять собой наименьшую дозу или наименьшую возможную дозу клеток, которые можно вводить индивидууму способом введения. В определенных вариантах осуществления стандартная доза представляет собой минимальное количество клеток или минимальное количество эталонных единиц или заданных эталонных единиц или эталонных единиц в пределах заданного диапазона, которые можно вводить в однократной дозе любому индивидууму с конкретным заболеванием или патологическим состоянием, или любому индивидууму, способами по настоящему документу.

[0819] В определенных вариантах осуществления количество клеток в стандартной дозе представляет собой количество клеток или количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор или экспрессирующих CAR клеток, или количество, процентное содержание, отношение, частоту и/или долю таких клеток определенного фенотипа, например, клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют один или

несколько маркеров, выбранных из CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA, аннексина V или активированной каспазы 3, которые необходимо вводить конкретному индивидууму в определенной дозе, например, индивидууму, у которого получены клетки. В определенных вариантах осуществления количество клеток в стандартной дозе представляет собой количество клеток или количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор или экспрессирующих CAR клеток, или количество, процентное содержание, отношение, частоту и/или долю таких клеток определенного фенотипа, например, CCR7⁺, CD27⁺, CD45RA⁺, CD45RA⁻, CD4⁺, CD8⁺, негативных по маркеру апоптоза (например, аннексин V⁻ или каспаза 3⁻) клеток, или клеток, которые позитивны или негативны по одному или нескольким из любых, указанных выше, которые необходимо вводить конкретному индивидууму в определенной дозе, например, индивидууму, у которого получены клетки.

[0820] В определенных вариантах осуществления количество клеток в стандартной дозе представляет собой количество клеток или количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор или экспрессирующих CAR клеток, или количество, процентное содержание, отношение и/или долю таких клеток определенного фенотипа, например, CCR7⁺/CD4⁺, CCR7⁺/CD8⁺, CD27⁺/CD4⁺, CD27⁺/CD8⁺, CD45RA⁺/CD4⁺, CD45RA⁺/CD8⁺, CCR7⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD8⁺, CD27⁻/CD4⁺, CD27⁻/CD8⁺, CD45RA⁻/CD4⁺, CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁺/CD27⁺/CD4⁺, CCR7⁺/CD27⁺/CD8⁺, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD4⁺, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁻/CD27⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD27⁻/CD8⁺ и негативных по маркеру апоптоза (например, аннексин V⁻ или каспаза 3⁻) клеток, которые необходимо вводить конкретному индивидууму в определенной дозе, например, индивидууму, у которого получены клетки. В определенных вариантах осуществления определенное количество клеток включает количество клеток или количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор или экспрессирующих CAR клеток, или количество, процентное содержание, отношение и/или долю таких клеток определенного фенотипа, например, CCR7⁺/CD4⁺, CCR7⁺/CD8⁺, CD27⁺/CD4⁺, CD27⁺/CD8⁺, CD45RA⁺/CD4⁺, CD45RA⁺/CD8⁺, CCR7⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD8⁺, CD27⁻/CD4⁺, CD27⁻/CD8⁺, CD45RA⁻/CD4⁺, CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁺/CD27⁺/CD4⁺, CCR7⁺/CD27⁺/CD8⁺, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD4⁺, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁻/CD27⁻/CD4⁺, CCR7⁻/CD27⁻/CD8⁺ и негативных по маркеру апоптоза (например, аннексин V⁻ или каспаза 3⁻) клеток и/или любое их подмножество, и которое необходимо вводить конкретному индивидууму в определенной дозе, например, индивидууму, у которого получены клетки. В определенных вариантах осуществления клетки получали у индивидуума, подлежащего лечению, способами, предоставленными в настоящем документе, или с его необходимостью.

[0821] В определенных вариантах осуществления инструкции определяют дозу или количество клеток или тип клеток и/или частоту, отношение и/или процентное содержание клеток или типов клеток, например, отдельные популяции, фенотипы или подтипы в композиции клеток, таких как клетки с фенотипами аннексин V⁻/CCR7⁺/CAR⁺;

аннексин V⁻/CCR7⁺/CAR⁺/CD4⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CAR⁺/CD8⁺; аннексин V⁻/CD27⁺/CAR⁺; аннексин V⁻/CD27⁺/CAR⁺/CD4⁺; аннексин V⁻/CD27⁺/CAR⁺/CD8⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺/CD4⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺/CD8⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺/CD4⁺; аннексин V⁻/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺/CD8⁺; аннексин V⁻/CCR7⁻/CD45RA⁻/CAR⁺; аннексин V⁻/CCR7⁻/CD45RA⁻/CAR⁺/CD4⁺; аннексин V⁻/CCR7⁻/CD45RA⁻/CAR⁺/CD8⁺; аннексин V⁻/CCR7⁻/CD27⁺/CAR⁺; аннексин V⁻/CCR7⁻/CD27⁺/CAR⁺/CD4⁺; аннексин V⁻/CCR7⁻/CD27⁺/CAR⁺/CD8⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CAR⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CAR⁺/CD4⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CAR⁺/CD8⁺; активированная каспаза 3⁻/CD27⁺/CAR⁺; активированная каспаза 3⁻/CD27⁺/CAR⁺/CD4⁺; активированная каспаза 3⁻/CD27⁺/CAR⁺/CD8⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺/CD4⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CD27⁺/CAR⁺/CD8⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺/CD4⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁺/CD45RA⁻/CAR⁺/CD8⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁻/CD45RA⁻/CAR⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁻/CD45RA⁻/CAR⁺/CD4⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁻/CD45RA⁻/CAR⁺/CD8⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁻/CD27⁺/CAR⁺; активированная каспаза 3⁻/CCR7⁻/CD27⁺/CAR⁺/CD4⁺; и/или активированная каспаза 3⁻/CCR7⁻/CD27⁺/CAR⁺/CD8⁺ или их сочетание.

[0822] В определенных вариантах осуществления промышленное изделие содержит стандартную дозу клеток, содержащую определенное количество, отношение или процентное содержание подвергнутых инженерии CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7), и/или определенное количество подвергнутых инженерии CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7; и/или определенное отношение CD8⁺ Т-клетки, которые экспрессируют CCR7 и/или CD4⁺ Т-клетки, которые экспрессируют CCR7. В определенных вариантах осуществления промышленное изделие содержит инструкции для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или нескольких ее стандартных доз и/или объема, соответствующего таким одной или нескольким стандартным дозам, и/или инструкции для оценки любого из фенотипов, описываемого в настоящем документе, и/или инструкции для определения дозы для введения и/или объема, соответствующего таким одной или нескольким стандартным дозам. Иллюстративные стандартные дозы определенного количества, отношения или процентное содержание экспрессирующих CAR⁺ клеток с конкретным фенотипом включают любые, как описано на всем протяжении настоящего описания.

[0823] В определенных вариантах осуществления каждый из контейнеров отдельно содержит стандартную дозу клеток, например, содержащую одно и то же или по существу одно и то же количество клеток или количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор или экспрессирующих CAR клеток, или количество таких клеток определенного фенотипа, например, CCR7⁺/CD4⁺, CCR7⁺/CD8⁺, CD27⁺/CD4⁺, CD27⁺/CD8⁺,

CD45RA⁺/CD4⁺, CD45RA⁺/CD8⁺, CCR7/CD4⁺, CCR7/CD8⁺, CD27/CD4⁺, CD27/CD8⁺, CD45RA⁻/CD4⁺, CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7⁺/CD27⁺/CD4⁺, CCR7⁺/CD27⁺/CD8⁺, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD4⁺, CCR7⁺/CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7/CD45RA⁻/CD4⁺, CCR7/CD45RA⁻/CD8⁺, CCR7/CD27/CD4⁺, CCR7/CD27/CD8⁺; и негативных по маркеру апоптоза (например, аннексин V⁻ или каспаза 3⁻) клеток. В определенных вариантах осуществления каждый из контейнеров отдельно содержит стандартную дозу клеток, например, содержащую одно и то же или по существу одно и то же количество заданных эталонных единиц или определенное количество эталонных единиц в пределах заданного диапазона.

[0824] В определенных вариантах осуществления промышленное изделие или набор содержит контейнер, необязательно флакон, содержащий множество CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и контейнер, необязательно флакон, содержащий множество CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В определенных вариантах осуществления промышленное изделие или набор содержит контейнер, необязательно флакон, содержащий множество CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и дополнительно в том же контейнере содержит множество CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В определенных вариантах осуществления с клетками находится криопротектор. В определенных аспектах контейнер представляет собой пакет.

[0825] Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пластиковые пакеты, такие как пакеты для инфузий. В конкретных вариантах осуществления контейнеры представляют собой пакеты, например, пластиковые пакеты, такие как пакеты, подходящие для инфузия клеток индивидуумам, например, пластиковые пластиковые или PVC пакеты и/или пакеты для в/в растворов. Пакеты в определенных вариантах осуществления являются герметичными и/или их можно стерилизовать так, чтобы обеспечить стерильные раствор и доставку клеток и композиций. В определенных вариантах осуществления емкость контейнеров, например, пакетов, составляет точно или приблизительно или по меньшей мере или приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 или 1000 мл, например, точно или приблизительно от 10 до точно или приблизительно 100 или точно или приблизительно от 10 до точно или приблизительно 500 мл. В определенных вариантах осуществления контейнеры, например, пакеты, представляют собой и/или сделаны из материала, который является стабильным и/или обеспечивает стабильное хранение и/или сохранность клеток при одной или нескольких различных температурах, например, при низких температурах, например, ниже точно или приблизительно или точно или приблизительно -20°C, -80°C, -120°C, 135°C и/или температурах, подходящих для криоконсервации, и/или других температурах, таких как температуры, подходящие для разморозки клеток и температура тела, например, точно или приблизительно 37°C, например, для обеспечения разморозки, например, в месте нахождения индивидуума или в месте нахождения лечения, например, у кровати, непосредственно перед лечением.

[0826] Контейнеры можно получать из множества материалов, таких как стекло или пластик. В определенных вариантах осуществления контейнер содержит один или несколько портов, например, стерильных портов доступа, например, для соединения системы трубок или канюляции с одной или несколькими трубками, например, для внутривенной или другой инфузии и/или для соединения с целями переноса в другой контейнер и из него, например, культуры клеток и/или пакетов для хранения или других контейнеров. Иллюстративные контейнеры включают пакеты для инфузий, пакеты для внутривенных растворов, флаконы, включая флаконы с пробками, прокалываемыми иглой для инъекций.

[0827] Промышленное изделие может дополнительно содержать вкладыш в упаковку или ярлык с одним или несколькими статьями идентификационной информации и/или инструкциями для применения. В определенных вариантах осуществления информация или инструкции указывает, что содержимое можно или необходимо использовать для лечения конкретного патологического состояния или заболевания и/или предоставления инструкций для него. Ярлык или вкладыш в упаковку могут указывать, что содержимое промышленного изделия предназначено для использования при лечении заболевания или патологического состояния. В определенных вариантах осуществления ярлык или вкладыш в упаковку предоставляют инструкции для лечения индивидуума, например, индивидуума у которого получены клетки, способом, включающим введение первой и одной или нескольких последующих доз клеток, например, по любому из вариантов осуществления предоставляемых способов. В определенных вариантах осуществления инструкции определяют введение в первой дозе одной стандартной дозы, например содержимого одного отдельного контейнера в промышленном изделии, с последующей одной или несколькими последовательными дозами в определенный момент времени или в пределах указанного временного окна и/или после выявления наличия или отсутствия или уровня или степени одного или нескольких факторов или исходов у индивидуума.

[0828] В определенных вариантах осуществления инструкции определяют введение одной или нескольких стандартных доз индивидууму. В определенных вариантах осуществления инструкции определяют введение дозы, определяемой способами, предоставленными в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления инструкции определяют способы определения и/или расчета соответствующей дозы на основе оценки экспрессии поверхностных клеточных маркеров.

[0829] В определенных вариантах осуществления ярлык или вкладыш в упаковку или упаковка содержат идентификатор для указания конкретного идентификатора индивидуума, у которого получают клетки и/или для введения. В случае аутологичного переноса, идентификатор индивидуума, у которого получают клетки, является таким же, как идентификатор индивидуума, которому клетки вводят. Таким образом, идентификационная информация может указывать, что клетки предназначены для введения конкретному пациенту, такому как пациент, у которого исходно получены

клетки. Такая информация может присутствовать у упаковочном материале и/или на ярлыке в форме штрих-кода или другого кодированного идентификатора, или может представлять собой указание имени и/или других идентификационных характеристик индивидуума.

[0830] В определенных вариантах осуществления промышленное изделие содержит один или несколько, как правило, множество контейнеров, содержащих композиции, содержащие клетки, например, их отдельные стандартные лекарственные формы, и дополнительно содержит один или несколько дополнительных контейнеров с содержащейся в них композицией, которая содержит дополнительное средство, такое как цитотоксическое или иное терапевтическое средство, например, которое предназначено для введения в комбинации, например, одновременно или последовательно, в любом порядке, с клетками. Альтернативно или дополнительно промышленное изделие может дополнительно содержать другой или тот же контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер. Оно может дополнительно содержать другие материалы, такие как другие буферы, разбавители, фильтры, трубки, иглы и/или шприцы.

[0831] Термин "вкладыш в упаковку" используют для обозначения инструкций, как правило, включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях о применении таких терапевтических продуктов.

[0832] В определенных вариантах осуществления промышленные изделия и/или наборы дополнительно содержат один или несколько реагентов для оценки биологических образцов, например, биологических образцов, полученных у индивидуумов, которые являются кандидатами для введения или которым необходимо вводить терапевтическое средство, и необязательно инструкции для применения реагентов или анализов. В определенных вариантах осуществления промышленное изделие и/или наборы содержат реагенты для определения уровней конкретных фенотипических маркеров, например, CD4, CD8, CCR7, CD27 и/или CD45RA, и конкретных маркеров, указывающих на апоптоз, таких как аннексин V и/или каспаза 3, и инструкции для определения. В определенных вариантах осуществления биологический образец представляет собой или получен из крови, плазмы или образца сыворотки. В определенных вариантах осуществления реагенты можно использовать до введения клеточного терапевтического средства или после введения клеточного терапевтического средства, в диагностических целях, для идентификации индивидуумов и/или для оценки исходов лечения и/или токсичности. Например, в определенных вариантах осуществления промышленное изделие и/или наборы дополнительно содержат реагенты для определения уровня конкретных поверхностных клеточных маркеров или других маркеров, которые ассоциированы с токсичностью, и инструкции для определения. В определенных вариантах осуществления реагенты содержат компоненты для проведения анализа *in vitro* для определения поверхностных клеточных маркеров или других маркеров, такого как иммунологический

анализ, анализ на основе аптамеров, гистологический или цитологический анализ или анализ уровня экспрессии иРНК. В определенных вариантах осуществления анализ *in vitro* выбран из твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), иммуноблоттинга, иммунопреципитации, радиоиммунологического анализа (RIA), иммуноокрашивания, анализа проточной цитометрией, поверхностного плазмонного резонанса (SPR), хемилюминесцентного анализа, хроматографического иммунологического анализа, анализа ингибирования и анализа авидности. В определенных аспектах реагент представляет собой связывающий реагент, который специфически связывается с поверхностными клеточными маркерами или другими маркерами. В определенных случаях связывающий реагент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, аптамер или зонд из нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления реагенты включают реагенты детекции, экспрессии и/или присутствия маркеров, таких как CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA, аннексин V или активированная каспаза 3.

V. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0833] Если не определено иначе, полагают, что все термины данной области, сокращения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в настоящем документе имеют то же значение, какое как правило понятно специалисту в области, к которой принадлежит заявляемый объект изобретения. В определенных случаях термины с общепринятыми значениями определены в настоящем документе для ясности и/или для справочного материала, и включение таких определений в настоящий документ не обязательно стоит рассматривать как наличие существенного отличия от того, что, как правило, понимают в данной области.

[0834] Как используют в настоящем документе, формы единственного числа включают указания на множественно число, если из контекста явно не следует иначе. Например, неопределенная форма означает "по меньшей мере один" или "один или несколько". Следует понимать, что аспекты и вариации, описываемые в настоящем документе, включают аспекты и вариации "состоящий" и/или "по существу состоящий".

[0835] На всем протяжении настоящего описания, различные аспекты заявляемого объекта изобретения представлены в формате диапазонов. Следует понимать, что описание в формате диапазонов приведено исключительно для удобства и краткости и его не следует рассматривать как неизменное ограничение области заявляемого объекта изобретения. Таким образом, описание диапазона следует рассматривать как конкретное описание всех возможных поддиапазонов, а также отдельных числовых значений в пределах этих диапазонов. Например, когда предоставлен диапазон значений, следует понимать, что каждое промежуточное значение между верхним и нижним пределами этого диапазона и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне включено в заявляемый объект изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены меньшие диапазоны, и они также включены в заявляемый объект изобретения, с учетом любого

конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны с исключением любого или всех из этих включенных пределов также включены в заявляемый объект изобретения. Это применимо вне зависимости от ширины диапазона.

[0836] Как используют в настоящем документе, термин "приблизительно" относится к обычному интервалу ошибок для соответствующего значения, легко определяемому специалистом в этой области техники. Указание "приблизительного" значения или параметра в настоящем документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые относятся к самому такому значению или параметру. Например, описание с обозначением "приблизительно X" включает описание "X".

[0837] Как используют в настоящем документе, перечисление, что положения нуклеотидов или аминокислот "соответствуют" положениям нуклеотидов или аминокислот в описываемой последовательности, такой как указана в списке последовательностей, относится к положениям нуклеотидов или аминокислот идентифицируют после выравнивания с описываемой последовательностью для максимизации идентификации с использованием стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP. Выравнивая последовательности, специалист в данной области может идентифицировать соответствующие остатки, например, с использованием консервативных и идентичных аминокислотных остатков в качестве руководства. Как правило, для идентификации соответствующих положений, последовательности аминокислот выравнивают так, что получают совпадение наивысшего порядка (см., например: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and 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).

[0838] Как используют в настоящем документе, термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к распространению другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Термин включает вектор в виде структуры самореплицирующейся нуклеиновой кислоты, а также вектор, встроенный в геном клетки-хозяина, в которую его ввели. Определенные векторы способны к контролю экспрессии нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы обозначают в настоящем документе как "экспрессирующие векторы". В число векторов входят вирусные векторы, такие как ретровирусные, например, гаммаретровирусные и лентивирусные векторы.

[0839] Термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используют взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают

"трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первично трансформированную клетку и потомство, происходящее от них, вне зависимости от количества пересевов. Потомство может быть не полностью идентично по содержанию нуклеиновых кислот родительской клетки, а может содержать мутации. В настоящий документ включено мутантное потомство, которое имеет те же функции или биологическую активность, которая была выявлена скринингом или отобрана в исходной трансформированной клетке.

[0840] Как используют в настоящем документе, указание, что клетка или популяция клеток "позитивны" по конкретному маркеру, относится к детектируемому присутствию на или в клетке конкретного маркера, как правило, поверхностного маркера. При указании поверхностного маркера, термин относится к наличию поверхностной экспрессии, как детектируют посредством проточной цитометрии, например, посредством окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и детекции указанного антитела, где окрашивание детектируют посредством проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем окрашивание, детектируемое при проведении той же процедуры с совпадающим по изотипу контролем в идентичных по другим характеристикам условиях и/или на уровне в значительной степени сходном с уровнем для клетки, для которой известно, что она позитивна по маркеру и/или на уровне, в значительной степени превышающем уровень для клетки, для которой известно, что она негативна по маркеру.

[0841] Как используют в настоящем документе, указание, что клетка или популяция клеток "негативны" по конкретному маркеру, относится к отсутствию существенного детектируемого присутствия конкретного маркера, как правило, поверхностного маркера на или в клетке. При указании поверхностного маркера, термин относится к отсутствию поверхностной экспрессии, как детектируют посредством проточной цитометрии, например, посредством окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и детекции указанного антитела, где окрашивание не детектируют посредством проточной цитометрии на уровне в значительной степени превышающем окрашивание, детектируемое при проведении той же процедуры с совпадающим по изотипу контролем в идентичных по другим характеристикам условиях и/или на уровне в значительной степени меньшем, чем уровень для клетки, для которой известно, что она позитивна по маркеру, и/или на уровне в значительной степени сходном по сравнению с уровнем для клетки, для которой известно, что она негативна по маркеру.

[0842] Как используют в настоящем документе, "процент (%)" идентичности аминокислотных последовательностей и "процент идентичности" при использовании в отношении аминокислотной последовательности (эталонной последовательности полипептида) определен как такое процентное содержание аминокислотных остатков в последовательности-кандидате (например, антитело или фрагмент индивидуума), которое идентично аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения пропусков, если необходимо, для

достижения максимального процента идентичности последовательностей, и не рассматривая никакие консервативные замены как часть идентичности последовательностей. Выравнивание с целями определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно проводить различными способами, которые известны специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания со сравнимаемыми полноразмерными последовательностями.

[0843] Замены аминокислот могут включать замену одной аминокислота в полипептиде на другую аминокислоту. Замена может представлять собой консервативную замену аминокислот или неконсервативную замену аминокислот. Замены аминокислот можно проводить в связывающей молекуле, например, антителе, представляющем интерес, и в продуктах, подвергаемых скринингу на требуемую активность, например, сохраненное/улучшенное связывание антигена, сниженную иммуногенность или улучшенные ADCC или CDC.

[0844] Аминокислоты, как правило, можно группировать в соответствии со следующими общими свойствами боковых цепей:

- (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, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0845] В определенных вариантах осуществления консервативные замены могут включать замену представителя одного из этих классов на другого представителя другого класса. В определенных вариантах осуществления неконсервативные аминокислотные замены могут включать замену представителя одного из этих классов на другой класс.

[0846] Как используют в настоящем документе, композиция относится к любой смеси двух или более продуктов, веществ или соединений, содержащей клетки. Она может представлять собой раствор, суспензию, жидкость, порошок, пасту, водный состав, неводный состав или любое их сочетание.

[0847] Как используют в настоящем документе, "индивидуум" представляет собой млекопитающее, такое как человек или другое животное, и, как правило, представляет собой человека.

VI. ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0848] В число предоставляемых вариантов осуществления входят:

1. Терапевтическая композиция, содержащая Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где по меньшей мере или приблизительно или точно или

приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности.

2. Терапевтическая композиция по варианту осуществления 1, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 50% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности.

3. Терапевтическая композиция по варианту осуществления 1, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 60% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности.

4. Терапевтическая композиция по варианту осуществления 1, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 70% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности.

5. Терапевтическая композиция по варианту осуществления 1, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 80% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности.

6. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-5, где:

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD8⁺ Т-клетки или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD4⁺ Т-клетки или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат по меньшей мере или приблизительно 30%, 50%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 100% CD8⁺ Т-клеток или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат по меньшей мере или приблизительно 30%, 50%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 100% CD4⁺ Т-клеток или состоят из них; и/или

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат приблизительно 1:1 или приблизительно от 1:3 до 3:1 или приблизительно от 1:2 до 2:1 CD4⁺:CD8⁺ Т-клеток или состоят из них.

7. Терапевтическая композиция, содержащая Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в

композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности, необязательно, где:

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD8⁺ Т-клетки или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD4⁺ Т-клетки или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат по меньшей мере или приблизительно 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 100% CD8⁺ Т-клеток или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат по меньшей мере или приблизительно 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 100% CD4⁺ Т-клеток или состоят из них; и/или

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат приблизительно 1:1 или приблизительно от 1:3 до 3:1 или приблизительно от 1:2 до 2:1 CD4⁺:CD8⁺ Т-клеток или состоят из них.

8. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-7, где общее количество Т-клеток в композиции или общее количество Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 на поверхности.

9. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-7, где все Т-клетки в композиции или все Т-клетки в композиции, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, позитивны по CD27 на поверхности.

10. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-7, где все Т-клетки в композиции или все Т-клетки в композиции, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и CD27 на поверхности.

11. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-10, где композиция содержит одну или несколько стандартных доз клеток.

12. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-11,

где стандартная доза или композиция всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно и/или

где стандартная доза или композиция всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем

приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток.

13. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-12, где композиция или стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток.

14. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-13, где композиция или стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

15. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-14, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в композиции или стандартной дозе, или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в композиции или стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки; или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в композиции или стандартной дозе, или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в композиции или стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки.

16. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-15, где стандартная доза клеток или композиция содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

17. Композиция по варианту осуществления 16, где определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CD27 и/или CD45RA на клетках.

18. Композиция по варианту осуществления 16 или варианту осуществления 17, где определенное количество клеток дополнительно экспрессирует или не экспрессирует

CD27 и/или CD45RA, необязательно, где определенное количество клеток дополнительно представляют собой CD27⁺- или CD45RA⁻-клетки.

19. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-15, где стандартная доза клеток или композиция содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

20. Композиция по варианту осуществления 19, где определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CCR7 и/или CD45RA на клетках.

21. Композиция по варианту осуществления 19 или варианту осуществления 20, где определенное количество клеток дополнительно экспрессирует или не экспрессирует CCR7 и/или CD45RA, необязательно, где определенное количество клеток дополнительно представляют собой CCR7⁺ или CD45RA⁻-клетки.

22. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-21, где стандартная доза клеток или композиция содержит определенное количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток.

23. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-21, где стандартная доза клеток или композиция содержит определенное количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток.

24. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-23, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или композиция, или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или композиции представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки.

25. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-24, где стандартная доза или количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 , точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 всех CD3⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD3⁺-клетки), или всех CD3⁺-клеток, каждое включительно.

26. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-24, где стандартная доза или количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, всего содержит не более чем приблизительно 5×10^8 , не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем

приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD3⁺-клеток или всех CD3⁺-клеток.

27. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-26, где общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые являются живыми или жизнеспособными.

28. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-27, где общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, и/или представляет собой общее количество таких клеток, которые негативны (-) по маркерам апоптоза, где маркеры апоптоза представляют собой аннексин V или активированную каспазу 3.

29. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-28, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный антигенный рецептор.

30. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-29, где рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который ассоциирован с клетками или тканями, вовлеченными в заболевание, нарушение или патологическое состояние, специфичен к ним и/или экспрессирован на них.

31. Композиция по варианту осуществления 30, где заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль.

32. Композиция по варианту осуществления 30 или варианту осуществления 31, где антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

33. Композиция по любому из вариантов осуществления 30-32, где антиген-мишень выбран из интегрина $\alpha\text{v}\beta 6$ (интегрин avb6), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-НЗ, B7-Н6, карбоангидраза 9 (CA9, также известного как CAIX или G250), раковотестикулярного антигена, антигена рака/семенников 1В (CTAG, также известного

как NY-ESO-1 и LAGE-2), раковоэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, хемокинового лиганда с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогенов, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолата альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора IL-22 альфа (IL-22Ra), рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, представителя А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антигена Льюиса Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, мезотелина, с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белка мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, специфического антигена предстательной железы, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфичного для патогена антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

34. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-33, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не являющийся TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

35. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-34, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

36. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-35, где рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен.

37. Композиция по варианту осуществления 36, где антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его фрагмент, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент.

38. Композиция по варианту осуществления 37, где фрагмент содержит переменные области антитела, связанные гибким линкером.

39. Композиция по варианту осуществления 37 или варианту осуществления 38, где фрагмент содержит scFv.

40. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-39, где рекомбинантный рецептор содержит область внутриклеточной сигнализации.

41. Композиция по варианту осуществления 40, где область внутриклеточной сигнализации содержит домен внутриклеточной сигнализации.

42. Композиция по варианту осуществления 41, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции сигнала первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

43. Композиция по варианту осуществления 42, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит домен внутриклеточной сигнализации цепи CD3, необязательно цепи CD3-зета (CD3 ζ) или его сигнальную часть.

44. Композиция по любому из вариантов осуществления 40-43, где рекомбинантный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации.

45. Композиция по любому из вариантов осуществления 40-44, где область внутриклеточной сигнализации дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен.

46. Композиция по варианту осуществления 45, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть.

47. Композиция по варианту осуществления 45 или варианту осуществления 46, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальные части.

48. Композиция по любому из вариантов осуществления 45-47, где костимулирующий сигнальный домен расположен между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации.

49. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-48, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, получаемые у индивидуума.

50. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-49, где Т-клетки являются аутологичными для индивидуума.

51. Композиция по любому из вариантов осуществления 1-50, где Т-клетки являются аллогенными для индивидуума.

52. Промышленное изделие, содержащее контейнер, содержащий композицию по любому из вариантов осуществления 1-51, и инструкции для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или нескольких ее стандартных доз и/или объема, соответствующего таким одной или нескольким стандартным дозам.

53. Промышленное изделие, содержащее:

контейнер, содержащий одну или несколько стандартных доз клеток, находящихся в одной или нескольких терапевтических композициях, где стандартная доза содержит множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих (необязательно, подвергнутые инженерии с экспрессией) рекомбинантный рецептор, где стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют (необязательно экспрессируют на поверхности) рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и

инструкции для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или нескольких ее стандартных доз и/или объема, соответствующего таким одной или нескольким стандартным дозам.

54. Промышленное изделие, содержащее:

контейнер, содержащий одну или несколько стандартных доз клеток, находящихся в одной или нескольких терапевтических композициях, где стандартная доза содержит множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих (необязательно, подвергнутые инженерии с экспрессией) рекомбинантный рецептор, где стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют (необязательно экспрессируют на поверхности) кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/ $CD4^+$ /CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ /CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и

инструкции для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или нескольких ее

стандартных доз и/или объема, соответствующего таким одной или несколькими стандартным дозам.

55. Промышленное изделие по варианту осуществления 53 или варианту осуществления 54, где стандартная доза клеток содержит композицию по любому из вариантов осуществления 1-51.

56. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 53-55, где стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD8^+/CCR7^+$ -клеток; и/или где стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD4^+/CCR7^+$ -клеток.

57. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 53-55, где стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD8^+/CD27^+$ -клеток; и/или где стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD4^+/CD27^+$ -клеток.

58. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 52-57,

где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 $CD8^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор $^+$ / $CD8^+$ -клетки), или $CD4^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор $^+$ / $CD4^+$ -клетки), рецептор $^+$ / $CD8^+/CCR7^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD4^+/CCR7^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+/CD27^+$ -клеток, каждое включительно и/или

где стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор $^+$ / $CD8^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD8^+/CCR7^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD4^+/CCR7^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+/CD27^+$ -клеток.

59. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 52-58, где стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор $^+$ / $CD8^+/CCR7^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор $^+$ / $CD4^+/CCR7^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+/CD27^+$ -клеток.

60. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 52-59, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор $^+$ / $CD8^+/CCR7^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или

приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

61. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 52-60, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки; или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки.

62. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 51-56 и 58-61, где стандартная доза клеток или композиция содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

63. Промышленное изделие по варианту осуществления 62, где определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CD27 и/или CD45RA на клетках.

64. Промышленное изделие по варианту осуществления 62 или варианту осуществления 63, где определенное количество клеток дополнительно экспрессирует или не экспрессирует CD27 и/или CD45RA, необязательно, где определенное количество клеток дополнительно представляют собой CD27⁺- или CD45RA⁺-клетки.

65. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 51-55 и 57-61, где стандартная доза клеток или композиция содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

66. Промышленное изделие по варианту осуществления 65, где определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CCR7 и/или CD45RA на клетках.

67. Промышленное изделие по варианту осуществления 65 или варианту осуществления 66, где определенное количество клеток дополнительно экспрессирует или не экспрессирует CCR7 и/или CD45RA, необязательно, где определенное количество клеток дополнительно представляют собой CCR7⁺ или CD45RA⁺-клетки.

68. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 51-67, где стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток.

69. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 51-67, где стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток.

70. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 51-69, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки.

71. Промышленное изделие, содержащее:

контейнер, содержащий одну или несколько стандартных доз клеток, находящихся в одной или нескольких терапевтических композициях, где стандартная доза содержит множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих, необязательно подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать, рекомбинантный рецептор, где стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и

инструкции для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или нескольких ее стандартных доз и/или объема, соответствующего таким одной или нескольким стандартным дозам.

72. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 63, 64 и 66-71, где стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

73. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 63, 64 и 66-71, где стандартная доза клеток содержит определенное количество CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

74. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 63, 64 и 66-73, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный

рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

75. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 63, 64 и 66-74, где стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

76. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 63, 64 и 66-75, где стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

77. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 63, 64 и 66-76, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

78. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 63, 64 и 66-77, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки.

79. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 63, 64 и 66-78, где стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

80. Промышленное изделие по варианту осуществления 79, где определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CD45RA на клетках.

81. Промышленное изделие по варианту осуществления 79 или варианту осуществления 80, где определенное количество клеток дополнительно экспрессирует или не экспрессирует CD45RA, необязательно, где определенное количество клеток дополнительно представляют собой CD45RA⁻-клетки.

82. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 52, 53, 55, 56, 58-64 и 66-81, где во множестве промышленных изделий или стандартных дозах, необязательно получаемых тем же способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 (CCR7⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

83. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 52-82, где стандартная доза или количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 , точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 всех CD3⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD3⁺-клетки), или всех CD3⁺-клеток, каждое включительно.

84. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 52-83, где стандартная доза или количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, всего содержат не более чем приблизительно 5×10^8 , не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD3⁺-клеток или всех CD3⁺-клетки.

85. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 52-84, где общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые являются живыми или жизнеспособными.

86. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 52-85, где общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, и/или представляет собой общее количество таких клеток, которые негативны (-

) по маркерам апоптоза, где маркеры апоптоза представляют собой аннексин V или активированную каспазу 3.

87. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 52-86, где инструкции определяют введение множества стандартных доз, содержащихся во множестве отдельных композиций.

88. Промышленное изделие по варианту осуществления 87, где множество отдельных композиций содержит первую композицию, содержащую одно из $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток, и вторую композицию, содержащую другое из $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток.

89. Промышленное изделие по варианту осуществления 88, где первая композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки.

90. Промышленное изделие по варианту осуществления 88, где первая композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки.

91. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 88-90, где инструкции определяют введение композиции, содержащей $CD8^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, и композиции, содержащей $CD4^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа, не более 30 минут, не более 15 минут, не более 10 минут или не более 5 минут или одновременно.

92. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 88-91, где инструкции определяют введение композиции, содержащей $CD8^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, до введения композиции, содержащей $CD4^+$ -клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или несколькими стандартным дозам.

93. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 88-92, где инструкции определяют введение композиции, содержащей $CD4^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, до введения композиции, содержащей $CD8^+$ -клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или несколькими стандартным дозам.

94. Промышленное изделие по любому из вариантов осуществления 52-93, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный антигенный рецептор.

95. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 1-94, где рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который ассоциирован с клетками или тканями, вовлеченными в заболевание, нарушение или патологическое состояние, специфичен к ним и/или экспрессирован на них.

96. Промышленное изделие или композиция по варианту осуществления 95, где заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль.

97. Промышленное изделие или композиция по варианту осуществления 95 или варианту осуществления 96, где антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

98. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 95-97, где антиген-мишень выбран из интегрина $\alpha v \beta 6$ (интегрин $\alpha v \beta 6$), антигена созреваия В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раковотестикулярного антигена, антигена рака/семенников 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), раково-эмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, хемокинового лиганда с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, белка эпидермального фактора роста (EGFR), укороченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогенов, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолата альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPCR5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора IL-22 альфа (IL-22Ra), рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, представителя А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антигена Льюиса Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, мезотелина, с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белка мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, специфического антигена предстательной железы, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2),

белка опухоли Вильмаса 1 (WT-1), специфичного для патогена антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

99. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 1-98, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не являющийся TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

100. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 1-99, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

101. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 1-100, где рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен.

102. Промышленное изделие или композиция по варианту осуществления 101, где антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его фрагмент, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент.

103. Промышленное изделие или композиция по варианту осуществления 102, где фрагмент содержит переменные области антитела, связанные гибким линкером.

104. Промышленное изделие или композиция по варианту осуществления 102 или варианту осуществления 103, где фрагмент содержит scFv.

105. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 1-104, где рекомбинантный рецептор содержит область внутриклеточной сигнализации.

106. Промышленное изделие или композиция по варианту осуществления 105, где область внутриклеточной сигнализации содержит домен внутриклеточной сигнализации.

107. Промышленное изделие или композиция по варианту осуществления 106, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции сигнала первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

108. Промышленное изделие или композиция по варианту осуществления 107, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит домен внутриклеточной сигнализации цепи CD3, необязательно цепи CD3-зета (CD3 ζ) или его сигнальную часть.

109. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 1-108, где рекомбинантный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации.

110. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 1-109, где область внутриклеточной сигнализации дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен.

111. Промышленное изделие или композиция по варианту осуществления 110, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть.

112. Промышленное изделие или композиция по варианту осуществления 110 или варианту осуществления 111, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальные части.

113. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 110-112, где костимулирующий сигнальный домен расположен между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации.

114. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 1-113, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, получаемые у индивидуума.

115. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 1-114, где Т-клетки являются аутологичными для индивидуума.

116. Промышленное изделие или композиция по любому из вариантов осуществления 1-114, где Т-клетки являются аллогенными для индивидуума.

117. Способ лечения, включающий введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием одной или нескольких стандартных доз терапевтической композиции по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 7 или терапевтической композиции, содержащей множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, и/или объема, соответствующего таким стандартным дозам, необязательно, где:

стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и/или

в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 (CCR7⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

118. Способ по варианту осуществления 117, где стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток.

119. Способ по варианту осуществления 117, где стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD4^+/CCR7^+$ -клеток.

120. Способ лечения, включающий введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием одной или нескольких стандартных доз терапевтической композиции по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 7 или терапевтической композиции, содержащей множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, и/или объема, соответствующего таким стандартным дозам, необязательно, где:

стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор $^+$ / $CD4^+/CD27^+$ -клетки), и/или определенное отношение рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клеток и рецептор $^+$ / $CD4^+/CD27^+$ -клеток и/или определенное отношение рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клеток и/или рецептор $^+$ / $CD4^+/CD27^+$ -клеток и другого подмножества клеток в композиции; и/или

в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CD27 ($CD27^+$ -клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

121. Способ по варианту осуществления 120, где стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD8^+/CD27^+$ -клеток.

122. Способ по варианту осуществления 120, где стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD4^+/CD27^+$ -клеток.

123. Способ по любому из вариантов осуществления 117-122, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 $CD8^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор $^+$ / $CD8^+$ -клетки), или $CD4^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор $^+$ / $CD4^+$ -клетки), рецептор $^+$ / $CD8^+/CCR7^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD4^+/CCR7^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+/CD27^+$ -клеток, каждое включительно.

124. Способ по любому из вариантов осуществления 117-123, где стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор $^+$ / $CD8^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD8^+/CCR7^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD4^+/CCR7^+$ -клеток, рецептор $^+$ / $CD8^+/CD27^+$ -клеток или рецептор $^+$ / $CD4^+/CD27^+$ -клеток.

125. Способ по любому из вариантов осуществления 117-124, где стандартная доза

всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток.

126. Способ по любому из вариантов осуществления 117-125, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

127. Способ по любому из вариантов осуществления 117-126, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки; или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки.

128. Способ по любому из вариантов осуществления 117-119 и 123-127, где стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

129. Способ по любому из вариантов осуществления 117-119 и 123-128, где определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CD27 и/или CD45RA на клетках.

130. Способ по любому из вариантов осуществления 120-127, где стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

131. Способ по любому из вариантов осуществления 120-127 и 130, где определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CCR7 и/или CD45RA на клетках.

132. Способ по варианту осуществления 131, где стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток.

133. Способ по любому из вариантов осуществления 129, 131 или 132, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки.

134. Способ по варианту осуществления 131, где стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток.

135. Способ по любому из вариантов осуществления 129, 131 или 132, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки.

136. Способ лечения, способ включающий введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием одной или нескольких стандартных доз композиции по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 7.

137. Способ по варианту осуществления 136, где:

стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и

в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 (CCR7⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

138. Способ лечения, способ включающий введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, и/или объема, соответствующего таким стандартным дозам, где:

стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих

рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и

в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 (CCR7⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

139. Способ по любому из вариантов осуществления 129 и 131-138, где стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

140. Способ по любому из вариантов осуществления 129 и 131-138, где стандартная доза клеток содержит определенное количество CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

141. Способ по любому из вариантов осуществления 129 и 131-140, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

142. Способ по любому из вариантов осуществления 129 и 131-141, где стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

143. Способ по любому из вариантов осуществления 129 и 131-142, где стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

144. Способ по любому из вариантов осуществления 129 и 131-143, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или

приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

145. Способ по любому из вариантов осуществления 129 и 131-144, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки.

146. Способ по любому из вариантов осуществления 129 и 131-145, где стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

147. Способ по любому из вариантов осуществления 129 и 131-146, где определенное количество или отношение дополнительно основано на экспрессии или отсутствии экспрессии CD45RA на клетках.

148. Способ по любому из вариантов осуществления 129 и 131-147, где определенное количество клеток дополнительно экспрессирует или не экспрессирует CD45RA, необязательно, где определенное количество клеток дополнительно представляют собой CD45RA⁻-клетки.

149. Способ по любому из вариантов осуществления 117-148, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 , точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD3⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD3⁺-клетки), или всех CD3⁺-клеток, каждое включительно.

150. Способ по любому из вариантов осуществления 117-149, где стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 5×10^8 , не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD3⁺-клеток или всех CD3⁺-клеток.

151. Способ по любому из вариантов осуществления 117-150, где общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻

-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые являются живыми или жизнеспособными.

152. Способ по любому из вариантов осуществления 117-151, где общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, и/или представляет собой общее количество таких клеток, которые негативны (-) по маркерам апоптоза, где маркеры апоптоза представляют собой аннексин V или активированную каспазу 3.

153. Способ по любому из вариантов осуществления 117-152, включающий введение множества стандартных доз, содержащихся во множестве отдельных композиций.

154. Способ по любому из вариантов осуществления 117-153, где множество отдельных композиций содержит первую композицию, содержащую одно из CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток, и вторую композицию, содержащую другое из CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток.

155. Способ по варианту осуществления 154, где первая композиция содержит CD8⁺ Т-клетки.

156. Способ по варианту осуществления 154, где первая композиция содержит CD4⁺ Т-клетки.

157. Способ по любому из вариантов осуществления 154-156, включающий введение композиции, содержащей CD8⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, и композиции, содержащей CD4⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа, не более 30 минут, не более 15 минут, не более 10 минут или не более 5 минут или одновременно.

158. Способ по любому из вариантов осуществления 154-157, включающий введение композиции, содержащей CD8⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, до введения композиции, содержащей CD4⁺-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или несколькими стандартным дозам.

159. Способ по любому из вариантов осуществления 154-158, включающий введение композиции, содержащей CD4⁺ Т-клетки, или одну или несколько их

стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, до введения композиции, содержащей CD8⁺-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или нескольким стандартным дозам.

160. Способ по любому из вариантов осуществления 117-159, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный антигенный рецептор.

161. Способ по любому из вариантов осуществления 117-160, где рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который ассоциирован с клетками или тканями, вовлеченными в заболевание, нарушение или патологическое состояние, специфичен к ним и/или экспрессирован на них.

162. Способ по варианту осуществления 161, где заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль.

163. Способ по варианту осуществления 161 или варианту осуществления 162, где антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

164. Способ по любому из вариантов осуществления 161-163, где антиген-мишень выбран из интегрина $\alpha\text{v}\beta 6$ (интегрин avb6), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-Н3, B7-Н6, карбоангидраза 9 (CA9, также известного как CAIX или G250), раковотестикулярного антигена, антигена рака/семенников 1В (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), раковоэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, хемокинового лиганда с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогенов, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолата альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора IL-22 альфа (IL-22Ra), рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, представителя А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антигена Льюиса Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, мезотелина, c-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1

(MUC1), MUC16, лигандов представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белка мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, специфического антигена предстательной железы, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфичного для патогена антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

165. Способ по любому из вариантов осуществления 117-164, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не являющийся TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

166. Способ по любому из вариантов осуществления 117-165, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

167. Способ по любому из вариантов осуществления 117-166, где рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен.

168. Способ по варианту осуществления 167, где антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его фрагмент, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент.

169. Способ по варианту осуществления 168, где фрагмент содержит переменные области антитела, связанные гибким линкером.

170. Способ по варианту осуществления 168 или варианту осуществления 169, где фрагмент содержит scFv.

171. Способ по любому из вариантов осуществления 117-161, где рекомбинантный рецептор содержит область внутриклеточной сигнализации.

172. Способ по варианту осуществления 171, где область внутриклеточной сигнализации содержит домен внутриклеточной сигнализации.

173. Способ по варианту осуществления 172, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции сигнала первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

174. Способ по варианту осуществления 173, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит домен внутриклеточной сигнализации цепи CD3, необязательно цепи CD3-зета (CD3 ζ) или его сигнальную часть.

175. Способ по любому из вариантов осуществления 117-174, где рекомбинантный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации.

176. Способ по любому из вариантов осуществления 117-175, где область внутриклеточной сигнализации дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен.

177. Способ по варианту осуществления 176, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть.

178. Способ по варианту осуществления 176 или варианту осуществления 177, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальные части.

179. Способ по любому из вариантов осуществления 176-178, где костимулирующий сигнальный домен расположен между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации.

180. Способ по любому из вариантов осуществления 117-179, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, получаемые у индивидуума.

181. Способ по любому из вариантов осуществления 117-180, где Т-клетки являются аутологичными для индивидуума.

182. Способ по любому из вариантов осуществления 117-180, где Т-клетки являются аллогенными для индивидуума.

183. Способ определения стандартной дозы подвергнутых инженерии Т-клеток для лечения индивидуума, где способ включает:

(а) оценку в терапевтической композиции, содержащей множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и CCR7 (рецептор⁺/CCR7⁺);

(b) на основе количества, процентного содержания или отношения рецептор⁺/CCR7⁺-клеток, определение одной или несколько стандартных доз клеток для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

184. Способ определения стандартной дозы подвергнутых инженерии Т-клеток для лечения индивидуума, где способ включает:

(а) оценку в терапевтической композиции, содержащей множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и $CD27$ (рецептор $^+$ / $CD27^+$); и

(b) основываясь на количестве, процентном содержании или отношении рецептор $^+$ / $CD27^+$ -клеток, определение одной или несколько стандартных доз клеток для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 ($CD27$) (рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CD27^+$ -клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют $CD27$ (рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CD27^+$ -клетки), и/или определенное отношение рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CD27^+$ -клеток и рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CD27^+$ -клеток и/или определенное отношение рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CD27^+$ -клеток и/или рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CD27^+$ -клеток и другого подмножества клеток в композиции.

185. Способ получения композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток, где способ включает:

(а) оценку в терапевтической композиции, содержащей множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и $CCR7$ и/или $CD27$ (рецептор $^+$ / $CCR7^+$ и/или рецептор $^+$ / $CD27^+$); и

(b) заполнение контейнера всей или частью композиции и необязательно другим раствором с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 ($CCR7$) (рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CCR7^+$ -клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют $CCR7$ (рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CCR7^+$ -клетки), и/или определенное отношение рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CCR7^+$ -клеток и рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CCR7^+$ -клеток и/или определенное отношение рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CCR7^+$ -клеток и/или рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CCR7^+$ -клеток и другого подмножества клеток в композиции, или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 ($CD27$) (рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CD27^+$ -клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют $CD27$ (рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CD27^+$ -клетки), и/или определенное отношение рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CD27^+$ -клеток и рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CD27^+$ -клеток и/или определенное отношение рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CD27^+$ -клеток и/или рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CD27^+$ -клеток и другого подмножества клеток в композиции.

186. Способ получения терапевтической композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток, способ, включающий заполнение контейнера всей или частью композиции Т-клеток, где композиция Т-клеток содержит Т-клетки, несущие рекомбинантный рецептор, который специфически связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или патологическим состоянием, с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

187. Способ получения терапевтической композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток, способ, включающий заполнение контейнера всей или частью композиции Т-клеток, где композиция Т-клеток содержит Т-клетки, несущие рекомбинантный рецептор, который специфически связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или патологическим состоянием, с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

188. Способ по любому из вариантов осуществления 184-187, где стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CCR7⁺-клеток.

189. Способ по любому из вариантов осуществления 184-188, где стандартная доза клеток содержит определенное количество CD4⁺/CCR7⁺-клеток.

190. Способ по любому из вариантов осуществления 184-189, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки) или стандартная доза всего содержит CD4⁺-клетка, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

191. Способ по любому из вариантов осуществления 184-180, где стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно $5 \times$

10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток.

192. Способ по любому из вариантов осуществления 184-191, где стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток.

193. Способ по любому из вариантов осуществления 184-192, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

194. Способ по любому из вариантов осуществления 184-193, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки; или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки.

195. Способ по любому из вариантов осуществления 184-194, где стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

196. Способ по любому из вариантов осуществления 184-195, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют CD27 и/или CD45, необязательно, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих CD27⁺- или CD45RA⁻-клетки.

197. Способ по любому из вариантов осуществления 184-196, дополнительно включающий оценку в терапевтической композиции количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CD27 и/или CD45RA, необязательно количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые представляют собой CD27⁺-клетки или CD45RA⁻-клетки.

198. Способ по варианту осуществления 196 или варианту осуществления 197, где стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток.

199. Способ по варианту осуществления 196 или варианту осуществления 197, где стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток.

200. Способ по любому из вариантов осуществления 196-199, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки.

201. Способ определения стандартной дозы подвергнутых инженерии Т-клеток для лечения индивидуума, где способ включает:

(а) оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CCR7⁺/CD27⁺);

(b) на основе количества, процентного содержания или отношения рецептор⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, определение одной или несколько стандартных доз клеток для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

202. Способ получения композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток, где способ включает:

(а) оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный

рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CCR7⁺/CD27⁺); и

(b) заполнение контейнера всей или частью композиции и необязательно другим раствором с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

203. Способ получения терапевтической композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток, способ, включающий заполнение контейнера всей или частью композиции Т-клеток, где композиция Т-клеток содержит Т-клетки, несущие рекомбинантный рецептор, который специфически связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или патологическим состоянием, с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

204. Способ по любому из вариантов осуществления 201-203, где стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

205. Способ по любому из вариантов осуществления 201-203, где стандартная доза клеток содержит определенное количество CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

206. Способ по любому из вариантов осуществления 201-205, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

207. Способ по любому из вариантов осуществления 201-206, где стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более

чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

208. Способ по любому из вариантов осуществления 201-207, где стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

209. Способ по любому из вариантов осуществления 201-208, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

210. Способ по любому из вариантов осуществления 201-209, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки.

211. Способ по любому из вариантов осуществления 201-210, где стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

212. Способ по любому из вариантов осуществления 201-211, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют CD45, необязательно, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих CD45RA⁻-клетки.

213. Способ по любому из вариантов осуществления 201-212, дополнительно включающий оценку в терапевтической композиции количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CD45RA, необязательно количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые представляют собой CD45RA⁻.

214. Способ получения композиции клеток, содержащей подвергнутые генетической инженерии клетки, где способ включает:

i) получение из полученного у индивидуума биологического образца входящей композиции, содержащей требуемый процент CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или

не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемый процент CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA;

ii) внесение во входящую композицию полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор; и

iii) стимуляцию клеток во входящей композиции до, в течение и/или после указанного внесения, где стимуляция включает инкубацию клеток в присутствии одного или нескольких стимулирующих средств, где указанная стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток;

где способ позволяет получать выходящую композицию, содержащую определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

215. Способ получения композиции клеток, содержащей подвергнутые генетической инженерии клетки, где способ, включает внесение во входящую композицию полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, где входящая композиция содержит требуемый процент CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемый процент CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, получаемый из полученного у индивидуума биологического образца, и входящую композицию стимулируют до, в течение и/или после указанного внесения посредством инкубации клеток в присутствии одного или нескольких стимулирующих средств, где указанная стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток; и где способ позволяет получать выходящую композицию, содержащую определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

216. Способ получения композиции клеток, содержащей подвергнутые генетической инженерии клетки, где способ включает:

i) выделение из получаемого у индивидуума биологического образца требуемого количества CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемого количества CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или

не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, таким образом, получая входящую композицию;

ii) внесение во входящую композицию полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор; и

iii) стимуляцию клеток во входящей композиции до, в течение и/или после указанного внесения, где стимуляция включает инкубацию клеток в присутствии одного или нескольких стимулирующих средств, где указанная стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток;

где способ позволяет получать выходящую композицию, содержащую определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

217. Способ получения композиции клеток, содержащей подвергнутые генетической инженерии клетки, где способ, включает внесение во входящую композицию полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, где входящую композицию получают посредством выделения из получаемого у индивидуума биологического образца требуемого количества CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемого количества CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и входящую композицию стимулируют до, в течение и/или после указанного внесения посредством инкубации клеток в присутствии одного или нескольких стимулирующих средств, где указанная стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток; и где способ позволяет получать выходящую композицию, содержащую определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

218. Способ по любому из вариантов осуществления 214-217, где входящая композиция содержит требуемый процент CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемый процент CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA.

219. Способ по любому из вариантов осуществления 214-217, где входящая композиция содержит требуемый процент CD4⁺/CCR7⁻, CD4⁺/CD27⁻,

CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-, CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-, CD8⁺/CCR7⁺-, CD8⁺/CD27⁺-, CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻- и/или CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺- клеток.

220. Способ по любому из вариантов осуществления 214-219, где выходящая композиция содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ - и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток, и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ - и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток; или

определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ - и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

221. Способ по любому из вариантов осуществления 214-219, дополнительно включающий определение одной или несколько стандартных доз композиции Т-клеток для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, где стандартная доза содержит всю или часть выходящей композиции, которая содержит:

определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции;

определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; или

определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и

рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

222. Способ по варианту осуществления 221, где стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CCR7⁺-клеток, CD4⁺/CCR7⁺-клеток, CD8⁺/CD27⁺-клеток, CD4⁺/CD27⁺-клеток, CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

223. Способ по варианту осуществления 221 или варианту осуществления 222, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 , каждое включительно, рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

224. Способ по любому из вариантов осуществления 221-223, где стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток; и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺; и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

225. Способ по любому из вариантов осуществления 221-224, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток; и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, или стандартная доза всего содержит рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺, и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

226. Способ по любому из вариантов осуществления 221-225, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки; и/или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки; и/или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки.

227. Способ по любому из вариантов осуществления 221-226, где стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1; и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1; и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

228. Способ по любому из вариантов осуществления 221-227, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют CD45, необязательно, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих CD45RA⁻-клетки.

229. Способ по варианту осуществления 228, где стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток.

230. Способ по любому из вариантов осуществления 221-229, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻- или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки.

231. Способ по любому из вариантов осуществления 214-230, где prior to the providing или выделение, способ включает определение количества, количества на единицу объема, количества на единицу массы и/или процентного содержания CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или CD4⁺ Т-клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA.

232. Способ по любому из вариантов осуществления 214-231, где одно или несколько стимулирующих средств способно к активации Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток и/или CD8⁺ Т-клеток; способно к индукции сигнала через комплекс TCR и/или способно к индукции пролиферации Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток и/или CD8⁺ Т-клеток.

233. Способ по любому из вариантов осуществления 214-232, где одно или несколько стимулирующих средств содержит первичное средство, которое связывается с участником комплекса TCR, необязательно, которое специфически связывается с CD3.

234. Способ по варианту осуществления 233, где одно или несколько стимулирующих средств дополнительно содержат вторичное средство, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой Т-клетки.

235. Способ по варианту осуществления 234, где костимулирующая молекула выбрана из группы, состоящей из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

236. Способ по варианту осуществления 234 или варианту осуществления 235, где первичное и вторичное средства содержат антитела, необязательно, где одно или несколько стимулирующих средств включают инкубацию с антителом к CD3 и антителом к CD28.

237. Способ по любому из вариантов осуществления 214-236, где одно или несколько стимулирующих средств находятся на поверхности твердой подложки, необязательно гранулы.

238. Способ по любому из вариантов осуществления 214-237, где одно или несколько стимулирующих средств выбраны из группы, состоящей из связывающих CD3 молекул; связывающих CD28 молекул; рекомбинантного IL-2; рекомбинантного IL-15 и рекомбинантного IL-7, вакцины, содержащей антиген, специфически распознаваемый антигенным рецептором, и антиидиотипического антитела, которое специфически связывается с антигенным рецептором или их сочетаний.

239. Способ по любому из вариантов осуществления 183-238, где терапевтическая композиция представляет собой композицию по варианту осуществления 1.

240. Способы по любому из вариантов осуществления 183-239, дополнительно включающие введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или нескольких ее стандартных доз и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам.

241. Способ по любому из вариантов осуществления 183-240, где в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 (CCR7⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем

на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

242. Способ по любому из вариантов осуществления 183-241, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 , точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD3⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD3⁺-клетки), или всех CD3⁺-клеток, каждое включительно.

243. Способ по любому из вариантов осуществления 183-242, где стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 5×10^8 , не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD3⁺-клеток или всех CD3⁺-клеток.

244. Способ по любому из вариантов осуществления 183-243, где общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые являются живыми или жизнеспособными.

245. Способ по любому из вариантов осуществления 183-244, где общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, и/или представляет собой общее количество таких клеток, которые негативны (-) по маркерам апоптоза, где маркеры апоптоза представляют собой аннексин V или активированную каспазу 3.

246. Способ по любому из вариантов осуществления 240-245, включающий введение множества стандартных доз, содержащихся во множестве отдельных композиций.

247. Способ по варианту осуществления 246, где множество отдельных композиций содержит первую композицию, содержащую одно из $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток, и вторую композицию, содержащую другое из $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток.

248. Способ по варианту осуществления 247, где первая композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки.

249. Способ по варианту осуществления 247, где первая композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки.

250. Способ по любому из вариантов осуществления 247-249, включающий введение композиции, содержащей $CD8^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, и композиции, содержащей $CD4^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа, не более 30 минут, не более 15 минут, не более 10 минут или не более 5 минут или одновременно.

251. Способ по любому из вариантов осуществления 247-250, включающий введение композиции, содержащей $CD8^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, до введения композиции, содержащей $CD4^+$ -клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или несколькими стандартным дозам.

252. Способ по любому из вариантов осуществления 247-250, включающий введение композиции, содержащей $CD4^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или несколькими стандартным дозам, до введения композиции, содержащей $CD8^+$ -клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или несколькими стандартным дозам.

253. Способ по любому из вариантов осуществления 183-252, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный антигенный рецептор.

254. Способ по любому из вариантов осуществления 183-253, где рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который ассоциирован с клетками или тканями, вовлеченными в заболевание, нарушение или патологическое состояние, специфичен к ним и/или экспрессирован на них.

255. Способ по варианту осуществления 254, где заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль.

256. Способ по варианту осуществления 254 или варианту осуществления 255, где антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

257. Способ по любому из вариантов осуществления 254-256, где антиген-мишень выбран из интегрина $\alpha\upsilon\beta 6$ (интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$), антигена созреваания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидраза 9 (CA9, также известного как CAIX или G250), раковотестикулярного антигена, антигена рака/семенников 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), раковоэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, хемокинового лиганда с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогенов, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолата альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора IL-22 альфа (IL-22Ra), рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, представителя А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антигена Льюиса Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, мезотелина, с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белка мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, специфического антигена предстательной железы, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белка опухоли Вильмаса 1 (WT-1), специфичного для патогена антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

258. Способ по любому из вариантов осуществления 183-257, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не являющийся TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

259. Способ по любому из вариантов осуществления 183-258, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

260. Способ по любому из вариантов осуществления 183-259, где рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен.

261. Способ по варианту осуществления 260, где антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его фрагмент, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент.

262. Способ по варианту осуществления 261, где фрагмент содержит переменные области антитела, связанные гибким линкером.

263. Способ по варианту осуществления 261 или варианту осуществления 262, где фрагмент содержит scFv.

264. Способ по любому из вариантов осуществления 183-263, где рекомбинантный рецептор содержит область внутриклеточной сигнализации.

265. Способ по варианту осуществления 264, где область внутриклеточной сигнализации содержит домен внутриклеточной сигнализации.

266. Способ по варианту осуществления 265, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции сигнала первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

267. Способ по варианту осуществления 266, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит домен внутриклеточной сигнализации цепи CD3, необязательно цепи CD3-зета (CD3 ζ) или его сигнальную часть.

268. Способ по любому из вариантов осуществления 183-267, где рекомбинантный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации.

269. Способ по любому из вариантов осуществления 183-268, где область внутриклеточной сигнализации дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен.

270. Способ по варианту осуществления 269, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть.

271. Способ по варианту осуществления 259 или варианту осуществления 270, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальные части.

272. Способ по любому из вариантов осуществления 269-271, где костимулирующий сигнальный домен расположен между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации.

273. Способ по любому из вариантов осуществления 183-272, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, получаемые у индивидуума.

274. Способ по любому из вариантов осуществления 183-273, где Т-клетки являются аутологичными для индивидуума.

275. Способ по любому из вариантов осуществления 183-274, где Т-клетки являются аллогенными для индивидуума.

276. Выходящая композиция, получаемая способом по любому из вариантов осуществления 183-275.

277. Стандартная доза, определяемая или получаемая способом по любому из вариантов осуществления 201-213 и 221-276.

278. Фармацевтическая композиция, содержащая стандартную дозу по варианту осуществления 277.

279. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 278, дополнительно содержащая фармацевтический носитель.

280. Способ лечения, включающий введение млекопитающему всей или части выходящей композиции по варианту осуществления 276, стандартной дозы по варианту осуществления 277 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 278 или варианту осуществления 279.

281. Применение всей или части выходящей композиции по варианту осуществления 276, стандартной дозы по варианту осуществления 277 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 278 или варианта осуществления 279 для лечения злокачественной опухоли.

282. Применение всей или части выходящей композиции по варианту осуществления 276, стандартной дозы по варианту осуществления 277 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 278 или варианта осуществления 279 в производстве лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли.

283. Выходящая композиция по варианту осуществления 276, стандартная доза по варианту осуществления 277 или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 278 или варианту осуществления 279 для применения в лечении злокачественной опухоли.

VII. ПРИМЕРЫ

[0849] Приводимые ниже примеры включены исключительно с иллюстративными целями и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1 Оценка признаков и фенотипов экспрессирующих CAR к CD19 Т-клеток и фармакокинетических (РК) параметров, ответа и токсичности

[0850] Проводили оценку зависимости между клеточными фенотипами Т-клеток, подвергнутых инженерии с экспрессией химерного антигенного рецептора (CAR) и фармакокинетические (РК) параметры, ответ и токсические исходы в клетках после введение индивидуумам.

А. Признаки композиции терапевтических Т-клеток

[0851] Получали иллюстративные композиции терапевтических Т-клеток, содержащие аутологичные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), специфичный к CD19. CAR с антителом к CD19 содержал scFv к CD19,

получаемый у мыши (вариабельная область, получаемая из FMC63, в ориентации V_L-линкер-V_H), получаемый из иммуноглобулина спейсер, трансмембранный домен, получаемый из CD28, костимулирующую область, получаемую из 4-1BB и домен внутриклеточной сигнализации CD3-зета. Вирусный вектор дополнительно содержал последовательности, кодирующие укороченный рецептор, который служил в качестве суррогатного маркера экспрессии CAR; отделяемый от последовательности CAR последовательностью проскока рибосомы T2A. Получаемые композиции терапевтических Т-клеток, используемые для введения индивидуумам с рецидивирующей и устойчивой неходжкинской лимфомы (NHL), описанной ниже, оценивали более чем по ста фенотипических, функциональных и связанных с жизнеспособностью клеток признакам, с использованием проточной цитометрии и анализов *in vitro*. Клетки оценивали по различным признакам до и после проведения инженерии.

[0852] Иллюстративные признаки, оценку которых проводили указаны в таблице Е1. Фенотипические признаки, как правило, ассоциированные с фенотипической композицией памяти и фенотипами жизнеспособности клеток оценивали с использованием проточной цитометрии. Функциональность Т-клеток оценивали с использованием антигенспецифичных биоанализов *in vitro*. Характеристику и тестирование высвобождения проводили на композициях терапевтических Т-клеток, которые подвергали репрезентативному количеству циклов замораживания-размораживания.

Таблица Е1: Репрезентативные характеризующие признаки, определяемые в композициях терапевтических клеток, содержащих Т-клетки с CAR к CD19
Жизнеспособность активность внутриклеточная каспаза-3 аннексин V
CCR7 (рецептор С-С хемокинов типа 7)
Воспалительные цитокины, такие как TNF-α (фактор некроза опухоли α)

[0853] Для получения клеток композиции для введения выделяли аутологичные клетки у индивидуумов посредством лейкофереза. Лейкоферез образцы подвергали to процесс for generation of экспрессирующ CAR клетки. Процесс involved отмывка клеток с использованием автоматизированн wash и иммуноаффинность based отбор for очистка CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, resulting in два композиции, обогащенн for CD8⁺ (in which средын of 99%, Inter Quartile Диапазон (IQR) 98-100%, клеток were CD8⁺) и CD4⁺ (in which средын of 99%, IQR 99-100%, клетки were CD4⁺) клетки, соответственно.

[0854] Клетки of обогащенн CD4⁺ и CD8⁺ композиции were раздельно subjected to лентивирусн трансдукция with вектор кодирующ an anti-CD19 CAR with a 4-1BB костимулирующ домен. Трансдуцированн популяции затем were раздельно инкубируют в присутствии стимулирующ реагенты for клетка рост. Expanded CD8⁺ и CD4⁺-клетки формулировали и подвергнут криоконсервации раздельно и stored до введения. To минимизировать variations, между lots и/или композиции клеток, получаем из различн пациенты, так как those having различн признаки пациентов, in параметры indicative

клетки health, клетки were held at константн volumes across lots. Клетка products exhibited a tight диапазон of жизнеспособн концентрации клеток (на основе оценки клетки композиции for одна группа индивидуумов, $CD8^+$: средьн 31×10^6 клеток/мл, IQR $28-40 \times 10^6$ клеток/мл, $N=38$; $CD4^+$: средьн 35×10^6 клеток/мл, IQR $31-40 \times 10^6$, $N=36$).

[0855] At the site введения, композиции клеток размораживали и вводим раздельно, according to заданн объем of кажд композиция соответствующ to количество $CD8^+CAR^+$ и $CD4^+CAR^+$ -клетки in the appropriate доза (так as for DL1, содержащий 5×10^7 total экспрессирующ CAR Т-клетки ($2,5 \times 10^7$ кажд of экспрессирующ CAR $CD4^+$ и экспрессирующ CAR $CD8^+$ -клетки), или DL2, содержащий 1×10^8 total экспрессирующ CAR Т-клетки (5×10^7 кажд of экспрессирующ CAR $CD4^+$ и экспрессирующ CAR $CD8^+$ -клетки)).

[0856] Параметры, указывающий на health of экспрессирующ CAR Т-клетки в композициях для введения оценивали, так как by measuring, post-thaw, жизнеспособность, клеточн поверхность аннексин V экспрессия и уровни of active внутриклеточн Каспаза 3. Средьн процентное содержание of аннексин V-экспрессирующ клетки was 11% (IQR 9-18%; $N=33$) $CD8^+CAR^+$ Т-клетки и 10% (IQR 8-17%; $N=31$) $CD4^+CAR^+$ Т-клетки. Каспаза 3 экспрессия наблюдали to be similar to аннексин V экспрессия.

[0857] The quantities of CAR^+CD4^+ и CAR^+CD8^+ Т-клетки в композиции для введения were точнly controlled. Количество клеток actually вводим to иллюстративн set индивидуумов наблюдали to be в пределах 8% или менее of требуем количество клеток for a given доза:

- $2,4-2,7 \times 10^7$ (заданн $\pm 8\%$) $CD4^+CAR^+$ Т-клетки и $2,4-2,7 \times 10^7$ (заданн $\pm 8\%$) $CD8^+CAR^+$ Т-клетки for индивидуумы, которым вводят клетки at DL1 ($n=48$)

- $4,6-5,1 \times 10^7$ (заданн $\pm 8\%$) $CD4^+CAR^+$ Т-клетки или $4,6-5,1 \times 10^7$ (заданн $\pm 8\%$) $CD8^+CAR^+$ Т-клетки for индивидуумы, которым вводят клетки at DL2 ($n=20$).

[0858] Диапазон of вводим доза was found to have низк variability in различн иллюстративн set индивидуумов:

- $48-52 \times 10^6$ $CD3^+CAR^+$ Т-клетка at DL1 ($n=34$)
- $96-101 \times 10^6$ $CD3^+CAR^+$ Т-клетки at DL2 ($n=29$)
- $24-27 \times 10^6$ $CD4^+CAR^+$ или $CD8^+CAR^+$ Т-клетки at DL1 ($n=34$)
- $46-51 \times 10^6$ $CD4^+CAR^+$ или $CD8^+CAR^+$ Т-клетки at DL2 ($n=29$).

[0859] As shown на фиг. 1A, экспрессирующ композиции CAR Т-клеток, вводимых to индивидуумы наблюдали to exhibit высок Т-клетка purity и низк variance между lots. In view, например, of процесс и продукт контролирует, композиции терапевтических клеток, содержащие CAR Т-клетки наблюдали to have низк lot-to-lot variability в клетке-специфичн Т-клетка функция.

[0860] In vitro антиген-специфичн цитокин накопление и внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) showed a similar низк variance между lots for продукция цитокинов for несколько цитокины (IL-2, TNF- α и IFN- γ). In иллюстративн ICS эксперимент, клетки from композиции стимулировали with CD19, stained for цитокины,

including TNF- α , и поперхностн белки, including рецептор C-C хемокинов типа 7 (CCR7) as память фенотип маркер, и analyzed посредством проточной цитометрии. Количество клеток в композиции для введения that were, позитивные по цитокины или поперхностн белки определяли. На **фиг. 1B** представлен количество CD4⁺CAR⁺- и CD8⁺CAR⁺-клетки, CD4⁺CAR⁺TNF- α ⁺ и CD8⁺CAR⁺TNF- α ⁺ клетки, CD4⁺CAR⁺CCR7⁺ и CD8⁺CAR⁺CCR7⁺ и, находящ в композиции CAR T-клеток для введения на уровнях дозы DL1 и DL2. На **фиг. 1C** представлен друг фигура depicting количество CD4⁺ CAR⁺-клетки, CD8⁺ CAR⁺-клетки, CD4⁺ CAR⁺ CCR7⁺-клетки и CD8⁺ CAR⁺ CCR7⁺-клетки in the controlled доза композиции, on различн scale. Эти результаты **приводит к** обобщены **обобщенно приведены** в таблице **E2**. Результаты show низк variability in количество CD4⁺CAR⁺- и CD8⁺CAR⁺-клетки, CD4⁺CAR⁺TNF- α ⁺ и CD8⁺CAR⁺TNF- α ⁺ клетки, CD4⁺CAR⁺CCR7⁺ и CD8⁺CAR⁺CCR7⁺-клетки. Например, a tight диапазон for количество клеток, позитивные по TNF- α продукция наблюдали (n=61).

Таблица E2: Controlled доза, Т-фенотипы клеток, и клетка специфичн функция (x 10⁶ клетки)												
	CD4 ⁺ CAR ⁺		CD8 ⁺ CAR ⁺		CD4 ⁺ CAR ⁺ TNF- α ⁺		CD8 ⁺ CAR ⁺ TNF- α ⁺		CD4 ⁺ CAR ⁺ CCR7 ⁺		CD8 ⁺ CA R ⁺ CCR7 ⁺	
	DL1	DL2	DL1	DL2	DL1	DL2	DL1	DL2	DL1	DL2	DL1	D L2
Сре дып	25,1	50,0	25,0	49,9	22,4	47,3	19,4	41,0	10,6	16,6	13,5	19, 9
IQR	24,7- 25,4	49,6- 50,4	24,8- 25,3	49,6- 50,3	21,1- 23,8	46,1- 48,4	17,1- 21,7	39,3- 45,5	6,2- 14,7	9,0- 29,4	5,4- 16,2	9,6 - 27, 9

[0861] А параметр, указывающий на продукция by CAR⁺-клетки of фактор некроза опухоли альфа (TNF α) after стимуляция with CD19 showed a narrow диапазон в число различн lots, with относителън стандартн отклонение (RSD) of 37% for CD4⁺CAR⁺ Т-клетки (N=59) и 51% for CD8⁺CAR⁺ Т-клетки (N=61).

[0862] Результаты were в соответствии с наблюдение that по меньшей мере три аспекты of the manufacturing и control процесс композиции клеток contributed to низк variability между композициями и стабильн клетка health: точн, стабильн постоянн доза of вводим CD4⁺ и CD8⁺-клетки; control и optimization CD4⁺ и CD8⁺ Т культура клеток патологическ состояния that результат **приводит к** in низк между-композиция lot variability of фенотипы (например, CCR7) и in vitro функция (например, IL-2, TNF- α и IFN- γ продукция after антиген стимуляция); и константн состав и объем композиции. Результаты также продемонстрировали, что жестк контроль количества CD4⁺ и CD8⁺

CAR⁺ Т-клетки в терапевтической композиции для введения индивидуумам, allows идентификацию of признаки клеток в композиции с подвергнутыми инженерии клетками (см. **фиг. 1С**) и potential ассоциация with фармакокинетика (ПК) и клиническ исходы, так как ответ и токсичность.

В. Введение of Anti-CD19 CAR⁺ Т Композиция клеток

[0863] Терапевтическ композиция CAR⁺ Т-клеток описанн выше вводили to индивидуумы with relapsed или устойчив (R/R) агрессивн неходжкинск лимфома (NHL) in клиническ исследование. Конкретно, a cohort of adult человек индивидуумы with R/R NHL, including диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL) de novo или трансформированную из медленнорастущей лимфома (NOS), высок-степень В-клеточн лимфома (including double/triple hit), DLBCL transformed from хроническ лимфоцитарн лейкоз (CLL) или marginal zone лимфомы (MZL), первичн медиастинальн Крупноклеточн В-клеточн лимфома (PMBCL), и фолликулярн лимфома степени 3b (FLG3B), вводили with anti-CD19 экспрессирующ композиции CAR Т-клеток. Исходы were раздельно оцениваем for a core подмножество индивидуумов в пределах the full cohort (excluding those индивидуумы with a poor performance status (ECOG 2), DLBCL transformed from marginal zone лимфомы (MZL) и/или хроническ лимфоцитарн лейкоз (CLL, Richter's), и excluding those индивидуумы with первичн медиастинальн Крупноклеточн В-клеточн лимфома (PMBCL), и фолликулярн лимфома степени 3b (FLG3B) (core cohort)). The core cohort included индивидуумы with DLBCL, NOS и transformed фолликулярн лимфома (tFL) или высок степень В-клеточн лимфома (double/triple hit) или высок-степень В-клеточн лимфома, with MYC и BCL2 и/или BCL6 реконфигурации with DLBCL histology (double/triple hit) и with Eastern Cooperative Oncology Группа performance status (ECOG PS) of 0 или 1. Анализ at this момент времени presented in this пример основана на оценки of a total of 91 индивидуумы in the full cohort (88 (65 from the CORE cohort) оцениваем for ответ и 91 (67 from the CORE cohort) оцениваем for безопасность) that had been вводим экспрессирующ CAR к CD19 клетки.

[0864] Антитело к CD19 CAR, содержащихся an anti-CD19 scFv, получаем из мыши (вариабельн область, получаем из FMC63, V_L-линкер-V_H orientation), получаемый из иммуноглобулина спейсер, трансмембранный домен, получаем из CD28, костимулирующ область, получаем из 4-1BB, и домен внутриклеточной сигнализации CD3-зета. Вирусн вектор дополнительно, содержащихся последовательности кодирующ укороченн рецептор, which served as суррогатн маркер for CAR экспрессия; разделяют from CAR последовательность by a T2A ribosome skip последовательность.

[0865] Подвергнут криоконсервации композиции клеток, содержащ экспрессирующ CAR к CD19 клетки размораживали prior to внутривенное введение. Терапевтическ Т-клетка доза вводили as определенн композиция клеток посредством введения формулируют CD4⁺ CAR⁺-популяция клеток и формулируют CD8⁺ CAR⁺ популяция раздельно вводим at заданн отношение of приблизительно 1:1. Индивидуумы вводили a single или double доза of экспрессирующ CAR Т-клетки (кажд однократн доза

via отдельн инфузии CD4⁺ экспрессирующ CAR T-клетки и CD8⁺ экспрессирующ CAR T-клетки, соответственно) as follows: однократн доза of уровень дозирования 1 (DL1), содержащий 5×10^7 total экспрессирующ CAR T-клетки, или однократн доза of уровень дозирования 2 (DL2), содержащий 1×10^8 total экспрессирующ CAR T-клетки. В определенных случаях индивидуумы вводили a double доза of DL1 in which кажд доза вводили с интервалом приблизительно четырнадцать (14) суток, вводим on сутки 1 и сутки 14, including один индивидуум that inadvertently received два DL2 дозы via два-доза schedule, due to дозирование error. Уровень дозирования и заданн numbers of T-клетка подмножества for вводим композиция на уровнях дозы DL1 и DL2 are set forth в таблице E3. In the core cohort, 34 индивидуумы вводили DL1 и 27 индивидуумы вводили DL2.

Таблица E3. Заданн уровень дозирования и количество of T-клетка подмножества for композиции клеток, содержащ anti-CD19 CAR T-клетки			
Уровень дозирования	Хелпер Т-клетка (T_H) Доза (CD4⁺CAR⁺)	Цитотоксическ Т Клетка (T_C) Доза (CD8⁺CAR⁺)	Total Т Клетка Доза (CD3⁺ CAR⁺)
1	25×10^6	25×10^6	50×10^6
2	50×10^6	50×10^6	100×10^6

С. Безопасность и Ответ Исходы после лечения

[0866] **Таблица E4** shows the overall ответ и безопасность исходы for the full cohort и the core cohort at два уровни дозирования. Частота объективного ответа (ORR) was 74%, including 52% индивидуумы who showed полный ответ (CR). The incidence любых степень синдрома высвобождения цитокинов (CRS) was 35%, with 1% тяжелый CRS; и the incidence любых степень of нейротоксичность (NT) was 19%, with 1% тяжелая NT.

Таблица E4. Ответ и Безопасность After CAR⁺ Клетка Введение				
	FULL	CORE		
	All Уровни дозирования	All Уровни дозирования^a	DL1	DL2
Best Overall Ответ (BOR), n^b	88	65	34	27
ORR,% (95% CI)	74 (63,83)	80(68, 89)	77 (59,89)	82 (62, 94)
CR,% (95% CI)	52 (41,63)	55(43, 68)	47 (30, 65)	63 (42, 81)
Безопасность, n^c	91	67	34	29
Люб CRS,% (95% CI)	35 (25, 46)	36 (24, 48)	41 (25, 59)	24 (10, 44)

sCRS(степень 3-4),% (95% CI)	1 (0, 6)	1 (0, 8)	38 (0, 15)	0
Люб NT,% (95% CI)	19 (11,28)	21 (12, 33)	24 (11, 41)	17 (6, 36)
sNT(степень 3-4),% (95% CI)	12 (6, 21)	15 (7, 26)	21 (9, 38)	7 (1, 23)

Четыре пациента treated on DL1D (уровень дозирования 1, два-доза schedule) with similar исходы.

^b Включает пациенты with event of PD, death, или 28-сутки restaging scans. Один пациент did not have restaging scans available.

^c Включает all индивидуумы who have received по меньшей мере один доза of conforming экспрессирующ CAR клетка продукт 28 суток prior to data snapshot date или died.

D. Фармакокинетическ Оценка

[0867] Numbers CAR⁺ Т-клеток in периферическ кровь и костн мозг at моменты времени before введение (pre-treatment или pre-лимфодеплеция химиотерапия (LDC)) и различн моменты времени post-treatment (with сутки введения as сутки 1) in 86 индивидуумы in the DLBCL cohort with evaluable PK, посредством проточной цитометрии с использованием антитела, специфичного к укороченн рецептор used as суррогатн маркер, и количественн полимеразн цепн реакция (кПЦР) с использованием праймеров, специфичн к посттранскрипционн регуляторн элемент вируса гепатита сурков (WPRE) present in вектор кодирующ химерный антигенный рецептор (CAR). Площадь под кривой plotting numbers на миллилитр for the indicated CAR⁺ популяция клеток между суток 0 и 28 (AUC₀₋₂₈; CAR⁺-клетки*сутки/мкл крови), the maximum или пик кровь концентрация of CAR⁺-клетки (C_{max}; CAR⁺-клетки/мкл крови) и время to C_{max} (T_{max}; суток) оценивали.

[0868] Иллюстративн graph depicting детектированн numbers CAR Т-клеток на миллилитр крови at различн indicated время-points, as оцениваем by кПЦР или проточн цитометрия is shown на фиг. 2. As shown на фиг. 2, уровни of экспрессирующ CAR клетки в образцах from индивидуумы наблюдали both посредством проточной цитометрии-based анализы и кПЦР-based анализы.

Пример 2 Ассоциация между Признаки клеток of Anti-CD19 CAR-Экспрессирующ Т Клетки и Фармакокинетическ (PK) Параметры, Ответ и Токсичность

[0869] Зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство** между оцениваем клеточн признаки Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать химерный антигенный рецептор (CAR) и фармакокинетическ (PK) параметры, ответ и токсичность исходы клеток upon введение to индивидуумы, как определяют в примере 1, оценивали.

A. Зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство** между Фармакокинетика/CAR⁺ Т-клетка Экспозиция **экспонирование** и Фенотип клеток

Признаки of Вводим Терапевтическая композиция клеток

[0870] Зависимость ****соответствие, взаимосвязь, родство****s оценивали между определенн фенотипическ признаки of CAR⁺ Т-клетки in терапевтическ композиции вводим, и параметры, ассоциированн с фармакокинетика (PK) или CAR⁺ Т-клетка экспозиция ****экспонирование**** и продукция цитокинов.

[0871] Конкретно ****в частности, особенно, в конкретн****, due to низк variability в число композиции терапевтических клеток подвергнут инженерии from клетки, получаем из, и формулируют для введения to, различн индивидуумы, it was possible для детекции фенотипы (например, CCR7⁺ экспрессия и продукция цитокинов), ассоциированн с фармакокинетическ параметры (например, AUC), клиническ ответ исходы и токсичность исходы (например, CRS или NT).

[0872] Клеточн поверхность уровни экспрессии или отсутствие экспрессии поверхностных клеточных маркеров that может свидетельствовать о определенн Т-клетка подтипы, так как память клетка подтипы, including рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7), CD27 и CD45RA, оценивали посредством проточной цитометрии. Поверхность уровни экспрессии CD3, CD4, CD8, CD28, и/или и укороченн рецептор used as суррогатн маркер, также оценивали; присутствие активированной каспазы 3 оценивали as a measure of apoptotic клетки. Продукция цитокинов (пг/мл) оценивали in CD8 клетки after стимуляция with CD19 (антиген, специфичн к экспрессируем CAR). Экспрессия маркеров и продукция цитокинов were коррелируют с площадь под кривой plotting numbers CAR⁺ Т-клеток (или их подмножеств) детектированн в крови индивидуумов, между суток 0 и 28 post-введение (AUC₀₋₂₈; сутки 0 as сутки of дозирование) и the maximum или пик кровь концентрация of CAR⁺-клетки (C_{max}) post-введение. The correlations оценивали с использованием univariate, multivariate, и machine learning based analyses.

[0873] В число the active каспаза 3-негативн (неапоптотическ) клетки в терапевтической композиции клеток, вводимых, the total процентное содержание или количество CCR7⁺-клеток, CD27⁺-клетки, CCR7⁺CD27⁺-клетки, или CD45RA⁺CCR7⁺-клетки, в число CD4 или CD8 CAR⁺ Т-клетки, в композиции вводим наблюдали to be прямо коррелируют with CD4 или CD8 C_{max} и AUC₀₋₂₈. The total процентное содержание или количество CD45RA⁺CCR7⁺ клетки наблюдали to be отрицательно коррелируют с CD4 или CD8 C_{max} и AUC₀₋₂₈. The total процентное содержание или количество CCR7⁺CD27⁺-клеток наблюдали to be отрицательно коррелируют с CD4 C_{max} и AUC₀₋₂₈. In vitro IL-2 продукция уровни upon стимуляция with CD19 наблюдали to be коррелируют с CD8 C_{max} и AUC₀₋₂₈.

[0874] На **фиг. 3А** представлены результаты исследования оценка зависимость ****соответствие, взаимосвязь, родство**** процентного содержания CCR7⁺-клетки (в число CD4⁺ CAR⁺- и CD8⁺ CAR⁺-популяции клеток) и фармакокинетика CD4⁺ CAR⁺-клетки и CD8⁺ CAR⁺-клетки, соответственно (как представлено посредством AUC₀₋₂₈ CD4⁺ или AUC₀₋₂₈ CD8⁺ CAR⁺-клетки в крови индивидуумов, которым проводили клеточную терапию). Каждая точка представляет отдельн пациент, с заштриховкой отдельных точек

indicating whether пациент received уровень дозирования 1 (DL1) или уровень дозирования 2 (DL2)). На фиг. 3B, так анализ is shown with результаты **приводит к** indicated раздельно for индивидуумы наблюдают to exhibit высок (при этой оценке, указанную посредством суммы произведений диаметров (SPD) value, превышающего или равного 50 см²) или низк (значение SPD of менее 50 см²) pre-treatment опухолев нагрузка (оцениваем при предшествующей обработке снижающей количество лимфоцитов химиотерапии). Процентное содержание CCR7⁺-клетки в число CD4⁺ CAR⁺-клетки в дозе вводим наблюдали to be прямо коррелируют with CD4⁺ AUC₀₋₂₈, и процентное содержание CCR7⁺-клетки в число CD8⁺ CAR⁺-клетки в дозе вводим наблюдали to be прямо коррелируют with CD8⁺ AUC₀₋₂₈. Кроме того, терапевтическ композиции с подвергнутыми инженерии клетками generated from клетки, получаем из индивидуумы in "высок" pre-treatment тяжесть заболевания группа наблюдали как правило, to exhibit a higher процентное содержание CCR7⁺-клетки, в число CD8⁺ и CD4⁺ композиции. На фиг. 3C представлен результаты для оценки зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство** между общее количество CCR7⁺ CD4⁺ CAR⁺ и CCR7⁺ CD8⁺ CAR⁺-клетки и AUC₀₋₂₈ CD4⁺ и AUC₀₋₂₈ CD8⁺ CAR⁺-клетки в крови индивидуумов, которым проводили клеточную терапию, соответственно.

[0875] In дополнительно оценка of зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство** между признаки CD4⁺ CAR⁺ Т-клетки и AUC₀₋₂₈ и C_{max} CD4⁺ или CD8⁺ CAR⁺ Т-клетки, процентное содержание CD4⁺ CAR⁺ Т-клетки that are CCR7⁺ или CCR7⁺ CD27⁺ наблюдали to be коррелируют с РК параметры (AUC₀₋₂₈ и C_{max}) CD4⁺ CAR⁺ Т-клетки (фиг. 3A, 3D-3F) и CD8⁺ CAR⁺ Т-клетки (фиг. 3G-3J). Результаты соответствуют наблюдение that CD4⁺ CAR⁺ Т-клетка help can support post CD8⁺ CAR⁺ Т-клетки.

[0876] Результаты were в соответствии с наблюдение that representation в композициях терапевтических клеток клеток, экспрессирующих определенн фенотипическ маркеры, так как those, указывающий на Т-клетка подтипы, так как память компартмент подтипы, например, CCR7 и/или CD27, прямо коррелируют with фармакокинетическ параметры, так как those, указывающий на degree воздействия to CAR⁺ Т-клетки, так как AUC₀₋₂₈ и/или C_{max} у индивидуумов, которым вводят определенн композиция клеток. В определенных аспектах CD45RA⁺ CCR7⁺ или CCR7⁺ CD27⁺-клетки в композиции CAR⁺ Т-клеток was отрицательно коррелируют с фармакокинетическ параметры.

В. Зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство** между Фармакокинетика/CAR⁺ Т-клетка Экспозиция **экспонирование**, Клиническ Ответ, Токсичность и Фенотип клеток Признаки of Вводим Терапевтическая композиция клеток

[0877] Зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство** между определенн фенотипическ признаки of CAR⁺ Т-клетки in терапевтическ композиции и параметры, ассоциированн с фармакокинетика (РК) или CAR⁺ Т-клетка экспозиция **экспонирование**, продукция цитокинов, клиническ ответ исходы и токсичность исходы оценивали. In анализ терапевтических композиций generated from и вводим to

иллюстративн группа индивидуумов, композиции with elevated частота клеток, экспрессирующих маркеры, указывающий на Т-клетка памяти подтипы exhibited a strong correlation with продукция цитокинов following in vitro CD19 стимуляция.

[0878] Клеточн поверхность уровни экспрессии of различн маркеры, presence of активируют каспазы, продукция цитокинов in $CD4^+$ и $CD8^+$ -клетки after стимуляция with CD19, фармакокинетическ (PK) параметры после введения (AUC_{0-28} и C_{max}) определяли как описано выше. Экспрессия маркеров и продукция цитокинов were коррелируют с AUC_{0-28} , C_{max} , и клиническ ответ исходы (including продолжительность жизни без прогрессирования и длительный ответ) и токсичность исходы (синдром высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичность (NT)), определять from evaluable индивидуумы in the core cohort описанн выше who had been вводим конкретн композиция CAR^+ Т-клеток. The correlations оценивали с использованием univariate, multivariate, и machine learning based analyses. A heatmap получали indicating nominal p-значения for различн признаки клеток и ассоциация with токсичность, ответ или фармакокинетическ (PK) параметры.

[0879] Результаты showed ассоциация между определенн функциональн профили, события безопасности и длительный ответ и частота клеток, экспрессирующих маркеры, указывающий на менее дифференцированн Т-клетка состояние, например, $CCR7^+CD27^+$. Конкретно, композиции with высок частота $CCR7^+$ -клетки, маркер, указывающий на централн Т-клетка памяти подтип, exhibited increased IL-2 продукция (Spearman $\rho=0,55$, $P<0,0001$). As shown на фиг. **4A-4B**, $CD4^+$ экспрессирующ композиции CAR Т-клеток, содержащий increased frequencies of менее дифференцированн $CCR7^+CD27^+$ CAR^+ Т-клетки secrete reduced $IFN\gamma$ (фиг. **4A**) и increased IL-2 (фиг. **4B**). In contrast, композиции with высок frequencies клеток, экспрессирующих маркеры, ассоциированные с эффектор дифференцированн Т-клетка подтипы exhibited increased $IFN\gamma$ продукция ($\rho=0,51$, $P<0,0001$) и IL-13 продукция ($\rho=0,45$, $P<0,0001$). As shown на фиг. **5A-5B**, $CD8^+$ экспрессирующ композиции CAR Т-клеток, содержащий increased frequencies of менее дифференцированн $CCR7^+CD27^+$ CAR^+ Т-клетки produce низк уровни of some цитокины, ассоциированн с Th2, так как IL-5 (фиг. **5A**) и IL-13 (фиг. **5B**).

[0880] The correlations между память фенотип в композиции и функция translated to позитивн correlation между central память подмножество композиция и пик in vivo рост of CAR^+ -клетки ($\rho=0,42$, $P=0,002$), и продолжительность жизни без прогрессирования (PFS) (Каплана-Мейера жизнеспособность estimate, $P=0,0164$) that наблюдали. **фиг. 6A-6D** show кривые выживаемости Каплана-Мейера for индивидуумы who вводили композиции CAR^+ Т-клеток, разделенн на группы, котор вводили композиции, содержащ частота $CCR7^+CD27^+$ CAR^+ Т-клетки в число $CD4^+$ CAR^+ Т-клетки (фиг. **6A** для продолжительности жизни без прогрессирования, **фиг. 6C** для длительности ответа) и в число $CD8^+$ CAR^+ Т-клетки (фиг. **6B** для продолжительности жизни без прогрессирования, **фиг. 6D** для длительности ответа), которое находится выше или ниже определенного порогового уровня. Higher $CCR7^+CD27^+$ память клетки в композиции наблюдали to be коррелируют с longer продолжительность жизни без прогрессирования.

[0881] Кроме того, CD4⁺ композиции CAR⁺ Т-клеток, содержащий an increased частота of a central память субпопуляция demonstrated зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство**s with whether индивидуум went on to develop токсичность после введения терапевтической композиции, either синдром высвобождения цитокинов (CRS, Степень 1 или более, P=0,0069; **фиг. 7A**) или severe нейротоксичность (NT, Степень 3 или более, P=0,0014, **фиг. 7C**). CD4⁺ композиции CAR⁺ Т-клеток with reduced IFN γ продукция were, ассоциированн с CRS (Степень 1 или более, P=0,0186; **фиг. 7B**) или тяжелая NT (Степень 3 или более, P=0,0055, **фиг. 7D**).

[0882] Результаты showed зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство** между композиция с подвергнутыми инженерии клетками признаки и РК, безопасность и исход в виде ответа вводимых клеток. Композиции with высок частота CCR7⁺-клетки наблюдали to have increased пик CAR⁺ клетка рост и продолжительность после введения в соответствии с наблюдение that менее дифференцированн CAR⁺ Т-клетки contribute to фармакокинетическ параметры и продолжительность жизни без прогрессирования. Результаты соответствуют наблюдение that фенотип и функциональн признаки и профили, ассоциированн с менее дифференцированн Т-клетка exhibited зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство**s with increased вероятность of NT или CRS, и improved длительность ответа

C. Мультипараметрическ Анализ фенотипа

[0883] Иллюстративн мультипараметрическ анализ фенотипа проводили на основе стохастическ вложение соседей с t-распределением (tSNE), для идентификации различн клетка подтип популяция с использованием проточн цитометрия. The tSNE анализ involved nonlinear dimensionality reduction to represent результаты in двухмерн space, including collapsing несколько признаки клеток onto двухмерн plot, и идентификация 6 различн клетка подтипы on двухмерн plot (см. **фиг. 8A**). Два признака that were преимущественно present in the plot were идентифицируют. As shown, Т-клетка памяти подмножество, экспрессирующ both CCR7 и CD27 (в пределах the boundary of the shape drawn on **фиг. 8A**, проточн цитометрия plot for CCR7 и CD27 экспрессия shown на **фиг. 8B**) was идентифицируют в число CD4⁺ и CD8⁺ CAR⁺ Т-клетки. As shown above на **фиг. 4A-4B** и **5A-5B**, идентифицируют клетки exhibited a distinct функциональн profile.

D. Conclusion

[0884] композиции CAR⁺ Т-клеток, вводимых индивидуумys exhibited низк variability, were pure и, содержащихся точн доза, allowing идентификацию of зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство**s между различными признаками клеток и клиническ исходы, так как ответ и токсичность. Популяции клеток, экспрессирующих маркеры, ассоциированные с память фенотипы exhibited специфичн функциональн профили (например, продукция цитокинов), with CCR7⁺CD27⁺ CD4⁺ CAR Т-клетки producing reduced IFN γ и increased IL-2, и CCR7⁺CD27⁺ CD8⁺ CAR Т-клетки producing reduced IL-5 и IL-13. Вводим композиции клеток, содержащ CAR⁺ Т-клетки in менее дифференцированное состояние, на основе фенотипы, так как CCR7⁺CD27⁺ экспрессия и

функциональн профили, так как продукция цитокинов, наблюдали to be, ассоциированн с фармакокинетическ параметры, события безопасности и ответ увеличенной длительности.

[0885] Дополнительно, в число варианты осуществления в настоящем документе предоставлены those involving способы и композиции providing for низк variability между lots композиций терапевтических клеток (так as those produced from starting популяции across диапазон of различн пациенты), так как those, содержащий anti-CD19 CAR⁺-клетки. В число предоставляемые варианты осуществления are those на основе the ability, например, which may be due in part to так низк градусов of variability, to stratify пациенты according to тяжесть заболевания и/или для идентификации определенн Т-фенотипы клеток или фенотипическ признаки that may be, ассоциированн с один или несколько исходы после введения, так как фармакокинетическ параметры of the anti-CD19 CAR⁺-клетки, например, факторы, указывающий на экспозиция ****экспонирование**** пациента to CAR-T-клетки после введения of the treatment, including maximum экспозиция ****экспонирование**** уровни или воздействие в течение времени, так как измеряют by AUC.

[0886] В определенных вариантах осуществления так параметры включают один или несколько маркеров, указывающий на подтипы одного или нескольких Т-клетка компартментс, так как признаки связан с маркеры, указывающий на память подтипы, including центральн Т-клетка памяти фенотип, так как CCR7⁺ или CD27⁺ экспрессия или процентное содержание и/или CCR7⁺ и/или CD27⁺-клетки. В определенных аспектах так результаты ****приводит к**** support дозирование на основе экспрессия одного или нескольких of так маркеры и/или признаки, так как посредством введения композиция клеток, including композиция клеток, экспрессирующих рекомбинантн рецептор (например, CAR), in which по меньшей мере определенн процентное содержание клеток are, позитивные по один или несколько так маркеры, например, CCR7 и/или CD27, и/или посредством введения дозы in which конкретн количество или процентное содержание клеток, экспрессирующих так маркеры, например, CCR7 и/или CD27, are indicated для введения, например, across ряд индивидуумов или indication. В число так варианты осуществления are those in which дозирование основана на определенное количество или фиксированн доза экспрессирующих рекомбинантн рецептор (например, CAR) клетки that are CCR7⁺. В определенных аспектах так подходы may limit или decrease доза-to-доза variability в число индивидуумы, которым вводят терапевтическая композиция. В определенных аспектах так подходы permit направленность ****направленн воздействие, взаимодействие, направленн на**** и/или control of конкретн фармакокинетическ признаки, так как degree of CAR⁺ Т-клетка уровни или экспозиция ****экспонирование**** in пациент, например, в течение определенного периода времени или at пик. В определенных аспектах так параметры представляют собой targeted to be в пределах an acceptable терапевтическ окно или диапазон, так как один наблюдают to be, ассоциированн с по меньшей мере требуем вероятность of конкретн ответ или эффективность outcome и below определенн вероятность или risk одного или нескольких неблагоприятн воздействия или токсичность

исходы, for вводим композиция терапевтических Т-клеток.

Пример 3 Идентификацию of Молекулярн сигнатуры of CAR⁺ Т Композиции клеток, ассоциированн с Длительный ответ

[0887] Геномн characterization studies, так как транскриптомн и эпигеномн analyses, проводили в дополнение к оценка of различн функциональн признак для идентификации молекулярных сигнатур в композициях CAR⁺ Т-клеток, котор ассоциированы с клиническ ответ, например, durable клиническ ответ upon CAR⁺ Т-клетка введение.

[0888] Композиции с подвергнутыми инженерии клетками, содержащ CAR⁺ Т-клетки generated как описано выше в примере 1, were индивидуум to анализ of приблизительно 100 фенотипическ и функциональн признаки, оценка экспрессии of приблизительно 20,000 transcript by высокопроизводительн РНК секвенирование (РНК-seq) и оценка of хроматин accessibility at приблизительно 100,000 регуляторн области посредством анализа for transposase-accessible хроматин с использованием секвенирование (ATAC-seq). Признаки анализировали by дискриминантн анализ с частичными наименьшими квадратами (PLS-DA) для идентификации переменные that discriminate между индивидуумы that exhibited полный ответ (CR) и индивидуумы that exhibited прогрессирующ заболевание (PD) или частичный ответ (PR), at 6 месяцев после введения композиции CAR⁺ Т-клеток. As shown на фиг. 9А-9С, оценка of фенотипическ и функциональн признаки и транскриптомн и эпигеномн analyses можно использовать для идентификации молекулярных сигнатур of подвергнут инженерии композиции CAR⁺ Т-клеток, котор ассоциированы с durable клиническ ответ (например, CR at 6 месяцев), у индивидуумов that had been вводим композиция с подвергнутыми инженерии клетками. Результаты соответствуют наблюдение that молекулярн сигнатуры that коррелируют с эффективность и безопасность можно идентифицировать на основе геномн characterization композиций с подвергнутыми инженерии клетками.

Пример 4 Ассоциация между Подтип клеток памяти Признаки in Т Композиции клеток Before и После проведения инженерии для экспрессии Химерный антигенный рецептор (CAR)

[0889] Различн признаки клеток, including экспрессия маркеров, указывающий на память подтипы, так как CCR7, CD27 и/или CD45RA, оценивали в композициях Т-клеток у индивидуума prior to инженерия, и композиции подвергнутых инженерии терапевтических клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR). Ассоциация между признаки in два популяции оценивали.

[0890] CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки выбирали by основанн на иммуноаффинности обогащение from лейкоцитоз of человек мононуклеарн клетки периферической крови (PBMC) from множество индивидуумов. А композиция of так отбирают Т-клетки (before генетическ инженерия, designated "pre-инженерия композиция") оценивали for различн признаки, including экспрессия поверхностных клеточных маркеров, указывающий на определенн Т-клетка подтипы, так как память клетка подтипы, including рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7), CD27 и CD45RA, и поверхностн экспрессия CD3, CD4, CD8,

CD28, и/или укороченн рецептор used as суррогатн маркер, и присутствие активированной каспазы 3 оценивали as a measure of apoptotic клетки. Отбирают Т-клетки were индивидуум to генетическ инженерия to экспрессируют an anti-CD19 CAR, after активация посредством инкубации с антителом к CD3 и антитела к CD28-coated гранулы в присутствии цитокины, followed посредством трансдукции with лентивирусн вектор кодирующ an anti-CD19 CAR, описанн в пример 1.A above. The resulting композиции клеток were expanded и подвергнут криоконсервации (после генетической инженерии, designated "композиция с подвергнутыми инженерии клетками"), и оцениваем for признаки клеток как описано выше. Spearman's rank-order коэффициенты корреляции for pairwise correlations между признаками клеток in pre-инженерия композиция и композиция с подвергнутыми инженерии клетками определяли.

[0891] **фиг. 10A-10B** show иллюстративн результаты ****приводит к**** of the correlation между частота $CD4^+CCR7^+CD27^+$ -клеток в композициях до проведения инженерии и частота $CD4^+CAR^+CCR7^+CD27^+$ -клеток в композициях с подвергнутыми инженерии клетками (**фиг. 10A**; коэффициент ранговой корреляции Спирмена: 0,591), и частота $CD8^+CCR7^+CD27^+$ -клеток в композициях до проведения инженерии и частота $CD8^+CAR^+CCR7^+CD27^+$ -клеток в композициях с подвергнутыми инженерии клетками (**фиг. 10B**; коэффициент ранговой корреляции Спирмена: 0,357). Результаты продемонстрировали, что экспрессия одного или нескольких маркеров, указывающий на память клетка подтипы, например, CCR7 и/или CD27, в композиции для введения с подвергнутыми инженерии клетками в определенных случаях were, ассоциированн с экспрессия маркеров in pre-инженерия композиция клеток. Результаты were в соответствии с a finding that композиция с подвергнутыми инженерии клетками, содержащий специфичн количество или процентное содержание клеток, экспрессирующих маркер(s), указывающий на память клетка подтипы, например, CCR7 и/или CD27, можно получать на основе количества или процентное содержание клеток, экспрессирующих маркер(s) in pre-инженерия композиция.

Пример 5: Оценка of наивн-Like Маркеры в композициях с подвергнутыми инженерии Т-клетками, содержащий CAR^+ Т-клетки.

[0892] Подвергнутые инженерии композиции первичных Т-клеток, содержащий Т-клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы (CARs) получали by два parallel процессы that utilized стимулирующий реагент, состоящ из paramagnetic полистирол-coated гранулы with attached антитела к CD3 и антитела к CD28 to activate Т-клетки перед трансдукцией вирусным вектором. In both процессы, клетки were подвергнут инженерии by лентивирусн трансдукция to экспрессируют the same anti-BCMA CAR. CAR, содержащихся scFv антигенсвязывающий домен, специфичн к BCMA, CD28 трансмембранн область, а 4-1BB костимулирующ сигнальн область, и CD3-зета derived домен внутриклеточной сигнализации. Процессы differed in their duration и in патологическ состояния for рост клеток. The produced композиции Т-клеток оценивали for поверхностн клеточн маркеры.

[0893] In both процессы, отдельные композиции $CD4^+$ и $CD8^+$ -клетки were выбранн из выделяют PBMC из образца лейкофереза from человек донор, и отбирают композиции клеток were подвергнут криоконсервации. Отдельные композиции $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток were затем размораживают и смешивать at отношение of 1:1 of жизнеспособные $CD4^+$ - Т-клетки to жизнеспособные $CD8^+$ - Т-клетки. Приблизительно 300×10^6 Т-клеток (150×10^6 $CD4^+$ и 150×10^6 $CD8^+$ Т-клетки) of смешивать входящая композиция клеток стимулировали посредством инкубации клеток в течение 18-30 часов в присутствии антитела к CD3/антитела к CD28 conjugated гранулы at a 1:1 гранула to клетка отношение в сыворотке free среды. Среда также, содержащих рекомбинантный IL-2, IL-7, и IL-15. После стимуляции, клетки отмывали и ресуспендируют в сыворотке free среды, содержащий добавки а также рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15.

[0894] In один процесс (иллюстративн non-расширенн способ), клетки из стимулированной композиции клеток were затем трансдуцированн with лентивирусн вектор кодирующ the anti-BCMA CAR by spinoculation. After the spinoculation, клетки отмывали и ресуспендируют в сыворотке free среды, содержащий рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15. Клетки of ресуспендируют композиции инкубировали at приблизительно $37,0^\circ\text{C}$ in an incubator. At приблизительно 96 часов after начало of стимуляция, клетки were rinsed twice в присутствии магнитн поле to remove the anti CD3/антитела к CD28 conjugated парамагнитн гранулы, и формулируют в растворе, содержащий 10% DMSO. Формулируют композиция клеток переносили to пакет или флакон и хранили at приблизительно -80°C .

[0895] In друг процесс (иллюстративн расширенн способ), following инкубация, приблизительно 100×10^6 жизнеспособн клетки из стимулированной композиции клеток концентрировали в сыворотке free среды, содержащий рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15. Клетки were трансдуцированн with лентивирусн вектор кодирующ the same anti-BCMA CAR как описано выше by spinoculation at приблизительно 1600 г в течение 60 минут. After spinoculation, клетки ресуспендировали в сыворотке free среды, содержащий рекомбинантный IL-2, IL-7, и IL-15, и инкубируют в течение приблизительно от 18 до 30 часов at приблизительно 37°C . Клетки were затем культивируют for рост by transfer to биореактор (например, встряхивание motion биореактор) in приблизительно 500 мл of иллюстративн сыворотка free среды, содержащий twice концентрация IL-2, IL-7, и IL-15 as used during инкубация и трансдукция этапы. When a set жизнеспособн плотность клеток was achieved, перфузия was initiated, where среда was replaced by semi-continuous перфузия with continual смешивание. Клетки культивировали the next сутки in биореактор until порогов значение плотность клеток of приблизительно 3×10^6 клеток/мл was achieved, which как правило, occurred in процесс involving 6-7 суток of рост. Антитела к CD3 и антитела к CD28 conjugated парамагнитн гранулы удаляли from композиция клеток by экспозиция **экспонирование** to магнитн поле. Клетки were затем collected, и формулируют и криопротекция как описано выше.

[0896] композиции Т-клеток produced с использованием иллюстративн expanded и

non-расширенн способes окрашивали with реагент recognizing поверхностн маркеры including CD4, CD8, CCR7 и CD27 и оцениваем посредством проточной цитометрии. Процентное содержание CD4⁺CAR⁺ и CD8⁺CAR⁺ Т-клетки позитивные на поверхности по both CCR7 и CD27 staining are shown на фиг. 11А. ФИГ. 11В и ФИГ. 11С depict процентное содержание CCR7+CD27+-клеток в число CD4⁺CAR⁺ Т-клетки и CD8⁺CAR⁺, соответственно, in the produced композиции Т-клеток, по сравнению с процентное содержание CCR7+CD27+-клеток in входящ композиции prior to инкубация с антителом к CD3/антитела к CD28 conjugated гранула стимулирующий реагент. As shown, a greater процентное содержание CCR7+CD27+ наблюдали в композициях Т-клеток produced from иллюстративн non-расширенн способ по сравнению с иллюстративн расширенн способ. Эти результаты **приводит к** соответствуют композиции с подвергнутыми инженерии клетками generated from иллюстративн non-расширенн способes having a greater часть клеток with наивн-like, менее дифференцированн фенотип than композиции клеток generated by иллюстративн расширенн способ.

[0897] Дополнительно анализ клеток generated by иллюстративн расширенн способ from типичн донор at различн суток during процесс of manufacture, including at активация, трансдукция или at различн times after начало культивирования (inoc +2, inoc +4 или inoc +5), demonstrate рост клеток ассоциирован с более дифференцированн фенотип, как определяют by a decreased процентное содержание CCR7+ CD27+-клетки (фиг. 11D).

Пример 6: Оценка of Т-клетка Клональность С использованием Секвенирование и Анализ Способы

[0898] Композиции Т-клеток оценивали for Т-клетка clonal abundance, с использованием single клетка секвенирование of Т-клеточн рецептор (TCR) pairs, before и после генетической инженерии для экспрессии химерный антигенный рецептор (CAR).

[0899] Аутологичн Т-клетки выделяли from индивидуумы via лейкофerez by иммуноаффинность based отбор for очистка CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, resulting in два композиции, обогащенн for CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки, соответственно. Клетки of обогащенн CD4⁺ и CD8⁺ композиции were активируют with связывающее CD3 средство/связывающее CD28 средство парамагнитн гранулы, а затем were раздельно subjected to лентивирусу трансдукция with вектор кодирующ an anti-CD19 CAR. Антитело к CD19 CAR, содержащихся an anti-CD19 scFv, получаем из мыши (вариабельн область, получаем из FMC63), получаемый из иммуноглобулина спейсер, трансмембранный домен, получаем из CD28, костимулирующ область, получаем из 4-1BB, и домен внутриклеточной сигнализации CD3-зета. Трансдуцированн популяции затем were раздельно инкубируют в присутствии стимулирующ реагенты for клетка рост. Expanded CD8⁺ и CD4⁺ композиции, содержащ экспрессирующ CAR Т-клетки формулировали и подвергнут криоконсервации раздельно и stored.

[0900] Клональность Т-клеток выделенных композиции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток перед проведением инженерии (CMAT) и CD4⁺ и CD8⁺ терапевтическ CAR⁺композиции Т-клеток после проведения инженерии by процесс описанн выше оценивали. Для оценки

клональность Т-клеток, клетки were индивидуум to single-клетка $\alpha\beta$ -paired TCR секвенирование, как правило, как описано в WO2016044227, WO2016176322 и WO2012048340. На основе barcoded single-клетка секвенирование of TCR гены, клональность Т-клеток и diversity of идентифицируют clones в популяция клеток определяли. В определенных случаях индекс Шеннона использовали as порогов значение to filter clones ("Shannon- adjusted клональность"), which preserves inter-образец зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство**s while eliminating образец noise. См., Chaara et al. (2018) Front Immunol 9:1038).

[0901] На **фиг. 12** представлен клональность of кажд образец after applying индекс Шеннона. As shown на **фиг. 12**, клональность CD4 и CD8 клетки differed в число композиции Т-клеток before и после генетической инженерии, with подвергнут инженерии композиции CAR⁺ Т-клеток exhibiting a reduced клональность по сравнению с Т-клетки в композициях до начала of процесс for инженерия клетки.

[0902] CD4⁺ и CD8⁺ терапевтическ CAR⁺композиции Т-клеток после генетической инженерии were sorted посредством проточной цитометрии экспрессия признака, указывающий на апоптоз, так как поверхность staining with аннексин V (аннексин V-) или каспаза 3 cleavage (indicating неапоптотическ клетки), и for экспрессия of различн поверхностн маркеры including CD45RA, CCR7, CD27, CD4 и CD8. Фенотип клеток was correlated to the degree of клональность клеток. It наблюдали that, in both CD4⁺ и CD8⁺ терапевтическ CAR⁺композиции Т-клеток, присутствие маркера апоптоза-негативн клетки that were CCR7/CD27⁻ прямо коррелируют highly with клональность клеток в композиции. Подобным образом, присутствие маркера апоптоза-негативн клетки that were CCR7⁺ или CCR7⁺/CD27⁺ отрицательно коррелируют с клональность клеток in кажд CD4⁺ и CD8⁺ терапевтическ CAR⁺композиции Т-клеток. Эти результаты **приводит к** соответствуют наблюдение that клональность клеток may be обратно коррелирует with менее дифференцированн, наивн-like клетки, так как определять by CCR7 и/или CD27 positivity.

Пример 7 Оценка of Зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство Между Клетка Фенотипическ и Функциональн признаки и Ответ**

[0903] Иллюстративн композиции терапевтических Т-клеток, содержащий аутологичн Т-клетки, экспрессирующие химерн антиген-рецептор (CAR), специфичн к CD19 получали и вводим to пациенты как описано в пример 1. Starting образцы, обогащенн CD4⁺ или CD8⁺ входящ композиции Т-клеток и generated композиции терапевтических Т-клеток, экспрессирующих an anti-CD19 CAR оценивали for a variety of признаки, including for различн фенотипическ, функция и клетка health related признаки, с использованием проточн цитометрия.

[0904] Признаки of generated композиции CAR⁺ Т-клеток анализировали via univariate анализ for зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство** to исход в виде ответа as оцениваем by comparing продолжительность жизни без прогрессирования (PFS) индивидуумов вводим композиции терапевтических Т-клеток. В число the top вариабельн признаки идентифицируют was the ability CD4⁺ CAR⁺ Т-клетки to produce IL-2 и TNF-

альфа цитокины in a non-CAR антиген-специфичн manner, так как in a flow-based способ внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) анализ, в ответ на РМА/иономицин в присутствии Golgi ингибитор. Конкретно **в частности, особенно, в конкретн**, ФИГ. 13A и 13B show PFS curves (Модель пропорциональных рисков Кокса (top) и оптимальное разделение (bottom)) для пациентов с "высок" или "низк" процентное содержание клеток producing IL-2 и TNF α продукция, соответственно, in CD4⁺/CAR⁺ Т-клетки терапевтической композиции, как определяют с использованием maximally отбирают rank statistics. As shown на фиг. 13A и 13B, группы вводим композиции терапевтических Т-клеток, содержащий higher уровни CD4⁺/CAR⁺ IL-2 или TNF α продукция showed improved жизнеспособность по сравнению с индивидуумы, которым вводят композиции терапевтических Т-клеток, содержащий a lower процентное содержание таких клеток.

[0905] до введения of CAR⁺ композиции терапевтических Т-клеток, индивидуумы оценивали for опухолев нагрузка by monitoring baseline сыворотка уровни of sum of products (SPD) как описано в пример 2. Baseline сыворотка уровни of С-реактивный белок (CRP) were также определять. После введения of экспрессирующ композиции CAR Т-клеток индивидуумам по существу **в значительной степени, значительно** как описано в пример 1, клиническ исход определяли for кажд индивидуум at 6 месяцев после введения и correlated to тяжесть заболевания. На фиг 14 представлен клиническ исход correlated to SPD или CRP уровни у индивидуумов exhibiting полный ответ (CR) (треугольники) или потеря ответа/отсутствие ответа (окружности)) at 6 месяцев. As shown на фиг. 14, пациенты with lower тяжесть заболевания, на что указывает **как указано by** низк baseline SDP (менее 50 см²) и низк значения CRP (менее 20 мг/л in baseline образцы), had сниженн риск of потеря ответа at 6 месяцев по сравнению с пациенты with высок тяжесть заболевания, на что указывает **как указано by** higher baseline SPD и значения CRP. Для пациентов с высок тяжесть заболевания, композиции терапевтических Т-клеток with increased частота CD4⁺CAR⁺ Т-клетки producing IL-2 экспрессия коррелируют с maintained ответ at 6 месяцев (фиг. 15) Similar результаты **приводит к** наблюдали for TNF-альфа. Эти data соответствуют наблюдение that определенн функциональн признаки CD4⁺ экспрессирующ CAR Т-клетки, так как способность к продукции IL-2 и TNF α , correlate положительно with maintained клиническ ответ, конкретно **в частности, особенно** у индивидуумов with высок тяжесть заболевания или baseline уровни of SPD или CRP приблизительно порогов значение.

[0906] Клетка health of входящ композиции отбирают и обогащенн for CD4⁺ или CD8⁺ (prior to инженерия with the anti-CD19 CAR) оценивали посредством проточной цитометрии for маркеры апоптоза (например, активированная каспаза 3). Зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство** между клетка health и ответ оценивали. As shown на фиг. 16 в число множество of обогащенн Т-клетка входящ композиции, иллюстративн tertile предельн **граница пропускания, граничн значение** значения for клетки, позитивн по маркеру апоптоза (например, активированная каспаза 3) in входящ композиции demonstrated зависимость **соответствие, взаимосвязь, родство** между

процент apoptotic клетки in the starting T-клетка материал used to generate композиция терапевтических T-клеток и вероятность of PFS. Результаты соответствуют an inverse correlation между процент маркер апоптоза+ клетки in исходн материал и improved продолжительность жизни без прогрессирования (PFS).

[0907] На фиг. 17 представлен процент клеток, позитивных по маркеру апоптоза (например, активированная каспаза 3) in обогащенн входящ композиции T-клеток с использованием процесс по существу **в значительной степени, значительно**, описанн в пример 1, as функция of возраст of the starting образец афереза, т.е. образцы varying in период времени (например, in часов) между аферез и its дополнительно обработка before обогащение T-клеток. Эти data are supportive of позитивн correlation между аферез возраст и присутствие клеток, позитивн по маркеру апоптоза.

[0908] The correlation между присутствие клеток, позитивн по маркеру апоптоза (например, активированная каспаза 3) in обогащенн CD8⁺ или CD4⁺ T-клетка исходн материал и различн друг параметры или признаки of трансдуцированн материал или of процесс или продукт характеристики обобщены **обобщенно приведены** в таблице E5. Эти data дополнительно support the finding thна стартеинг T-клетка материал apoptotic profile коррелирован с терапевтическая композиция quality.

Таблица E5: Indicated attribute correlation with активированная каспаза 3 in starting T-клетка материал		
Attribute	Коэффициент корреляции	значение P
Трансдуцированн Материал	-0,49	3,32E-08
Жизнеспособность		
Total Doublings	0,46	1,00E-06
Жизнеспособность	-0,42	2,56E-06
Аферез Возраст	0,38	4,26E-05
Жизнеспособн Клетка Концентрация	-0,37	3,31E-05
CCR7+CD27+	-0,37	1,93E-05
IL-2 секреция	-0,26	3,78E-03

[0909] The above результаты **приводит к** are supportive of модель in which определенн correlative переменные, ассоциированн с характеристики of процесс и/или generated CAR⁺ композиция терапевтических T-клеток may predict или indicate вероятность that индивидуум is likely to exhibit PFS that is durable. С использованием conditional inference trees to recursively partition кривые выживаемости, in which partitions проводили recursively until no дополнительно splits were significant, как определяют с использованием permutations to infer мультиплетность adjusted p-значения (Bonferroni correction), a decision tree of переменные that correlate to длительность of PFS was developed. Модель inferred an improved вероятность of длительность ответа in which переменные included низк уровень маркера апоптоза⁺/CD3⁺/CAR⁺-клетки in starting T-

клетка материал (например, обогащен $CD8^+$ Т-клетки), относительно низк numbers of doublings клеток during способ получения композиции терапевтических Т-клеток, и относительно низк процентное содержание CAR^+CD4^+ -клеток в число клетки композиции- терапевтических Т-клеток негативны по цитокины (например, IL-2 или TNF) following антиген-independent стимуляция (например, responsive to РМА/Иономицин in анализ внутриклеточных цитокинов).

[0910] Настоящее изобретение не предназначено для ограничения области конкретных описанных вариантов осуществления, которые предоставлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Из описания и руководств в настоящем документе очевидны различные модификации описанных композиций и способов. Такие вариации можно практически реализовать без отклонения от реального объема и сущности описания, и предусмотрено, что они попадают в объем настоящего изобретения.

Последовательности

№	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	Аннотация
1	ESKYGPPCPPCP	спейсер (шарнир IgG4) (а/к)
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCT	спейсер (шарнир IgG4) (н)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	спейсер шарнир-CH3
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	спейсер шарнир-CH2-CH3
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRG GEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQD LWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEG LLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQ RLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFS PPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLR VPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH	IgD-шарнир-Fc
6	LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR	T2A
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINAT	tEGFR

	NIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKT VKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLA VVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLF GTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRD CVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECL PQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGEN NTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPPTNGPKI PSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	
8	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 153- 179 номера доступа P10747)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 114- 179 номера доступа P10747)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR S	CD28 (аминокислоты 180- 220 P10747)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR S	CD28 (LL to GG)
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE L	4-1BB (аминокислоты 214- 255 Q07011.1)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3-зета
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3-зета
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3-зета
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAF	tEGFR

	RGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLH AFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATG QVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAH YIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPN CTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGI GLFM	
17	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGGG)5-P-, где P is пролин, G is глицин и S is серин	Линкер
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	Линкер
24	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatccca	сигнальная последовательность альфа-цепи GMCSFR
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	сигнальная последовательность альфа-цепи GMCSFR
26	MALPVTALLLPLALLHA	сигнальный пептид CD8 альфа
27	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
28	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
29	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCP RCPEPKSCDTPPPCPRCP	Шарнир
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Шарнир
31	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
34	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир

35	RASQDISKYLN	CDR L1
36	SRLHSGV	CDR L2
37	GNTLPYTFG	CDR L3
38	DYGVS	CDR H1
39	VIWGSETTYYN SALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3
41	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP RKGLEWLGVWVGSETTYYN SALKSRLTIKDNSKSQVFLKM NSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	VH
42	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N WYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGGTKLEIT	VL
43	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N WYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKG EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP RKGLEWLGVWVGSETTYYN SALKSRLTIKDNSKSQVFLKM NSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	scFv
44	KASQNVGTNVA	CDR L1
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISSVVDIFYFDY	CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTA YMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDIFYFDYWGQGT TVT VSS	VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKP GQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKD LADYFCQQYNRYPYTSGGGGTKLEIKR	VL
52	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTA	scFv

	YMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGTTVT VSSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTC KASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFT GSGSGTDFLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKL EIKR	
54	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
55	HTSRLHS	LC-CDR2
56	QQGNTLPYT	LC-CDR3
57	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgacc atcagctgccgggcccagccaggacatcagcaagtacctaactggtatcagcagaagcccg acggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgccagccg gttttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaa gatatgccacctacttttgccagcagggcaacacactgccctacaccttggcggcggaaca aagctggaaatcacccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcag caccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggccccagccaga gcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggat ccggcagccccccaggaagggcctggaatggctgggcgtgatctggggcagcgagacca cctactacaacagcggcctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaacagcaagagcca ggtgttcctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactcgccaagc actactactacggcggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgt gagcagc	Последовательность кодирующая scFv
58	X ₁ PPX ₂ P X ₁ is глицин, цистеин или аргинин X ₂ is цистеин или треонин	Шарнир
59	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Терапевтическая композиция, содержащая Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности.

2. Терапевтическая композиция по п. 1, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 50% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности.

3. Терапевтическая композиция по п. 1, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 60% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности.

4. Терапевтическая композиция по п. 1, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 70% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности.

5. Терапевтическая композиция по п. 1, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 80% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности.

6. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-5, где:

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD8⁺ Т-клетки или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD4⁺ Т-клетки или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат по меньшей мере или приблизительно 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 100% CD8⁺ Т-клеток или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат по меньшей мере или приблизительно 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 100% CD4⁺ Т-клеток или состоят из них; и/или

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат приблизительно 1:1 или приблизительно от 1:3 до 3:1 или приблизительно от 1:2 до 2:1 CD4⁺:CD8⁺ Т-клеток или состоят из них.

7. Терапевтическая композиция, содержащая Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности, необязательно, где:

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD8⁺ Т-клетки или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD4⁺ Т-клетки или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат по меньшей мере или приблизительно 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 100% CD8⁺ Т-клеток или состоят из них;

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат по меньшей мере или приблизительно 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 100% CD4⁺ Т-клеток или состоят из них; и/или

Т-клетки в композиции и/или Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, содержат приблизительно 1:1 или приблизительно от 1:3 до 3:1 или приблизительно от 1:2 до 2:1 CD4⁺:CD8⁺ Т-клеток или состоят из них.

8. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-7, где общее количество Т-клеток в композиции или общее количество Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 на поверхности.

9. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-7, где все Т-клетки в композиции или все Т-клетки в композиции, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, позитивны по CD27 на поверхности.

10. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-7, где все Т-клетки в композиции или все Т-клетки в композиции, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и CD27 на поверхности.

11. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-10, где композиция содержит одну или несколько стандартных доз клеток.

12. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-11,

где стандартная доза или композиция всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 всех CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или всех CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток,

рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно; и/или

где стандартная доза или композиция всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток.

13. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-12, где композиция или стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток; и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток.

14. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-13, где стандартная доза или композиция всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

15. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-14, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или композиция, или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или композиции представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺ или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺; или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или композиция, или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или композиции представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺ или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺.

16. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-15, где стандартная доза или композиция содержит определенное количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

17. Терапевтическая композиция по п. 16, где определенное количество или отношение клеток дополнительно представляют собой $CD27^+$ - или $CD45RA^-$ -клетки.

18. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-15, где стандартная доза или композиция содержит определенное количество рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CD27^+$ -клеток и рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CD27^+$ -клеток или определенное отношение рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CD27^+$ -клеток и рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CD27^+$ -клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

19. Терапевтическая композиция по п. 18, где определенное количество или отношение клеток дополнительно представляют собой $CCR7^+$ или $CD45RA^-$ -клетки.

20. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-19, где стандартная доза или композиция содержит определенное количество рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CCR7^+$ / $CD27^+$ -клеток и/или рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CCR7^+$ / $CD45RA^-$ -клеток; и/или стандартная доза или композиция содержит определенное количество рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CCR7^+$ / $CD27^+$ -клеток и/или рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CCR7^+$ / $CD45RA^-$ -клеток.

21. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-20, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор $^+$ -клеток в стандартной дозе или композиция, или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор $^+$ -клеток в стандартной дозе или композиции представляют собой рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CCR7^+$ / $CD27^+$ -клетки, рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CCR7^+$ / $CD45RA^-$ -клетки, рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CCR7^+$ / $CD27^+$ -клетки или рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CCR7^+$ / $CD45RA^-$ -клетки.

22. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-21, где стандартная доза или количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, всего содержат точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 , точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 всех $CD3^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор $^+$ / $CD3^+$ -клетки), или всех $CD3^+$ -клеток, каждое включительно; и/или стандартная доза или количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, содержат не более чем приблизительно 5×10^8 , не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор $^+$ / $CD3^+$ -клеток или всех $CD3^+$ -клеток.

23. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-22, где общее количество $CD3^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD3^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD8^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD4^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CCR7^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CCR7^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CD27^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CD27^+$ -

клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые являются живыми или жизнеспособными.

24. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-23, где общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, и/или представляет собой общее количество таких клеток, которые негативны (-) по маркерам апоптоза, где маркеры апоптоза представляют собой аннексин V или активированную каспазу 3.

25. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-29, где рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который ассоциирован с клетками или тканями, вовлеченными в заболевание, нарушение или патологическое состояние, специфичен к ним и/или экспрессирован на них.

26. Терапевтическая композиция по п. 25, где заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль.

27. Терапевтическая композиция по любым из п. 25 или п. 26, где антиген-мишень выбран из интегрина $\alpha\text{v}\beta 6$ (интегрин $\alpha\text{v}\beta 6$), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-Н3, B7-Н6, карбоангидраза 9 (CA9, также известного как CAIX или G250), раковотестикулярного антигена, антигена рака/семенников 1В (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), раковоэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина А2, хемокинового лиганда с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфатпротеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина В2, рецептора эфрина А2 (EPHa2), рецептора эстрогенов, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолата альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного

ассоциированного с меланомой антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора IL-22 альфа (IL-22R α), рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13R α 2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, представителя А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антигена Льюиса Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белка мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, специфического антигена предстательной железы, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), связанного с тирозинкиназой белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gr75), связанного с тирозинкиназой белка 2 (TRP2, также известного как дофакромтауомераза, дофакром-дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белка опухоли Вильмаса 1 (WT-1), специфичного для патогена или экспрессируемого на патогене антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

28. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-27, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

29. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-28, где рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и область внутриклеточной сигнализации, содержащая домен внутриклеточной сигнализации, и дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации.

30. Терапевтическая композиция по п. 28, где антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его фрагмент, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент.

31. Терапевтическая композиция по п. 30, где фрагмент содержит scFv.

32. Терапевтическая композиция по любому из пп. 29-31, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит домен внутриклеточной сигнализации цепи CD3, необязательно цепи CD3-зета (CD3 ζ) или его сигнальную часть.

33. Терапевтическая композиция по любому из пп. 29-32, где область внутриклеточной сигнализации дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен.

34. Терапевтическая композиция по п. 33, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть.

35. Терапевтическая композиция по п. 33 или п. 34, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальные части.

36. Терапевтическая композиция по любому из пп. 33-35, где костимулирующий сигнальный домен расположен между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации.

37. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-36, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, получаемые у индивидуума.

38. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-37, где Т-клетки являются аутологичными для индивидуума.

39. Терапевтическая композиция по любому из пп. 1-37, где Т-клетки являются аллогенными для индивидуума.

40. Терапевтическая композиция клеток по любому из пп. 37-39, где у индивидуума диагностирована злокачественная опухоль, необязательно, где злокачественная опухоль представляет собой лейкоз или лимфому.

41. Терапевтическая композиция клеток по п. 40, где индивидуум представляет собой индивидуума, у которого на момент получения клеток, идентифицирована высокая опухолевая нагрузка или известно о ее наличии.

42. Терапевтическая композиция клеток по п. 41, где:

у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если сумма продуктивных размеров (SPD) опухоли у индивидуума точно или приблизительно превышает 30 см^2 , 40 см^2 , 50 см^2 , 60 см^2 или 70 см^2 ; и/или

у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если содержание С-реактивного белка (CRP) в биологическом образце, необязательно образце сыворотки, полученной у индивидуума, точно или приблизительно превышает 5 миллиграмм на литр, 10 миллиграмм на литр, 15 миллиграмм на литр, 20 миллиграмм на литр, 25 миллиграмм на литр, 30 миллиграмм на литр, 40 миллиграмм на литр или 50 миллиграмм на литр.

43. Терапевтическая композиция клеток по п. 42, где у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если SPD опухоли у индивидуума точно или приблизительно превышает 50 см^2 .

44. Терапевтическая композиция клеток по п. 42 или п. 43, где у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если содержание CRP в биологическом образце точно или приблизительно превышает 20 миллиграмм на литр.

45. Промышленное изделие, содержащее контейнер, содержащий композицию по любому из пп. 1-44, и инструкции для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или

нескольких ее стандартных доз и/или объема, соответствующего таким одной или нескольким стандартным дозам.

46. Промышленное изделие, содержащее:

контейнер, содержащий одну или несколько стандартных доз клеток, находящихся в одной или нескольких терапевтических композициях, где стандартная доза содержит множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих (необязательно, подвергнутые инженерии с экспрессией) рекомбинантный рецептор, где стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют (необязательно экспрессируют на поверхности) рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и

инструкции для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или нескольких ее стандартных доз и/или объема, соответствующего таким одной или нескольким стандартным дозам.

47. Промышленное изделие, содержащее:

контейнер, содержащий одну или несколько стандартных доз клеток, находящихся в одной или нескольких терапевтических композициях, где стандартная доза содержит множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих (необязательно, подвергнутые инженерии с экспрессией) рекомбинантный рецептор, где стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют (необязательно экспрессируют на поверхности) кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/ $CD4^+$ /CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ /CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и

инструкции для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или нескольких ее стандартных доз и/или объема, соответствующего таким одной или нескольким стандартным дозам.

48. Промышленное изделие по п. 46 или п. 47, где стандартная доза клеток содержит композицию по любому из пп. 1-44.

49. Способ лечения, включающий введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием одной или нескольких стандартных доз терапевтической

композиции по п. 1 или п. 7 или терапевтической композиции, содержащей множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, и/или объема, соответствующего таким стандартным дозам, необязательно, где:

стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и/или

в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 (CCR7⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

50. Способ по п. 49, где стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD8^+$ /CCR7⁺-клеток; и/или стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD4^+$ /CCR7⁺-клеток.

51. Способ лечения, включающий введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием одной или нескольких стандартных доз терапевтической композиции по п. 1 или п. 7 или терапевтической композиции, содержащей множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, и/или объема, соответствующего таким стандартным дозам, необязательно, где:

стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/ $CD4^+$ /CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ /CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и/или

в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CD27 (CD27⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

52. Способ по п. 51, где стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD8^+$ /CD27⁺-клеток; и/или стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD4^+$ /CD27⁺-клеток.

53. Способ по любому из пп. 49-52, где:

стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно;

стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток; и/или

стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток.

54. Способ по любому из пп. 49-53, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

55. Способ по любому из пп. 49-54, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки; или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки.

56. Способ по любому из пп. 49, 50 и 53-55, где стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

57. Способ по любому из пп. 51-55, где стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

58. Способ по п. 56 или п. 57, где стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток; и/или стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток.

59. Способ по п. 58, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки; и/или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки.

60. Способ лечения, способ включающий введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием одной или нескольких стандартных доз композиции по п. 1 или п. 7.

61. Способ по п. 60, где:

стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и

в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 (CCR7⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

62. Способ лечения, способ включающий введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, содержащей множество $CD8^+$ и/или $CD4^+$ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, и/или объема, соответствующего таким стандартным дозам, где:

стандартная доза клеток содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD8^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор $CD4^+$ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; и

в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 (CCR7⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

63. Способ по любому из пп. 58-62, где стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток; и/или стандартная доза клеток содержит определенное количество $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

64. Способ по любому из пп. 58-63, где:

стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 $CD8^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/ $CD8^+$ -клетки), или $CD4^+$ -клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/ $CD4^+$ -клетки), рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток, или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно;

стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/ $CD8^+$ -клеток или рецептор⁺/ $CD4^+$ -клеток, рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток; и/или

стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/ $CD8^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/ $CD4^+$ /CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

65. Способ по любому из пп. 58-64, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или

приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

66. Способ по любому из пп. 58-65, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки.

67. Способ по любому из пп. 58-66, где стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

68. Способ по любому из пп. 49-67, где определенное количество клеток дополнительно экспрессирует или не экспрессирует CD45RA, необязательно, где определенное количество клеток дополнительно представляют собой CD45RA⁻-клетки.

69. Способ по любому из пп. 49-68, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 , точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD3⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD3⁺-клетки), или всех CD3⁺-клеток, каждое включительно.

70. Способ по любому из пп. 49-69, где стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 5×10^8 , не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD3⁺-клеток или всех CD3⁺-клеток.

71. Способ по п. 70, где общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые являются живыми или жизнеспособными.

72. Способ по любому из пп. 49-71, где общее количество $CD3^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD3^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD8^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD4^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CCR7^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CCR7^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CD27^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CD27^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CCR7^+$ / $CD27^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CCR7^+$ / $CD27^+$ -клеток, общее количество рецептор $^+$ / $CD8^+$ / $CCR7^+$ / $CD45RA^-$ -клеток и/или рецептор $^+$ / $CD4^+$ / $CCR7^+$ / $CD45RA^-$ -клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, и/или представляет собой общее количество таких клеток, которые негативны (-) по маркерам апоптоза, где маркеры апоптоза представляют собой аннексин V или активированную каспазу 3.

73. Способ по любому из пп. 49-72, включающий введение множества стандартных доз, содержащихся во множестве отдельных композиций.

74. Способ по п. 73, где множество отдельных композиций содержит первую композицию, содержащую одно из $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток, и вторую композицию, содержащую другое из $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток.

75. Способ по п. 74, где первая композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки.

76. Способ по п. 74, где первая композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки.

77. Способ по любому из пп. 49-76, включающий введение композиции, содержащей $CD8^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, и композиции, содержащей $CD4^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам с интервалом не более 48 часов.

78. Способ по п. 77, где композиция, содержащий $CD8^+$ Т-клетки или одна или несколько ее стандартных доз и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам и композиция, содержащий $CD4^+$ Т-клетки или одна или несколько ее стандартных доз и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам вводят с интервалом не более 36 часов, с интервалом не более 24 часов, с интервалом не более 12 часов, с интервалом не более 6 часов, с интервалом не более 4 часов, с интервалом не более 2 часов, с интервалом не более 1 часа или с интервалом не более 30 минут.

79. Способ по п. 77 или п. 78, где композиция, содержащий $CD8^+$ Т-клетки или одна или несколько ее стандартных доз и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам и композиция, содержащий $CD4^+$ Т-клетки или одна или несколько ее стандартных доз и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам вводят с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа, не более 30 минут, не более 15 минут, не более 10 минут или не более 5 минут или одновременно.

80. Способ по любому из пп. 73-79, включающий введение композиции, содержащей CD8⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, до введения композиции, содержащей CD4⁺-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или нескольким стандартным дозам.

81. Способ по любому из пп. 73-79, включающий введение композиции, содержащей CD4⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, до введения композиции, содержащей CD8⁺-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или нескольким стандартным дозам.

82. Способ определения стандартной дозы подвергнутых инженерии Т-клеток для лечения индивидуума, где способ включает:

(а) оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и CCR7 (рецептор⁺/CCR7⁺);

(b) на основе количества, процентного содержания или отношения рецептор⁺/CCR7⁺-клеток, определение одной или несколько стандартных доз клеток для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

83. Способ определения стандартной дозы подвергнутых инженерии Т-клеток для лечения индивидуума, где способ включает:

(а) оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и CD27 (рецептор⁺/CD27⁺); и

(b) основываясь на количестве, процентном содержании или отношении рецептор⁺/CD27⁺-клеток, определение одной или несколько стандартных доз клеток для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CD27

(рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

84. Способ получения композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток, где способ включает:

(а) оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и CCR7 и/или CD27 (рецептор⁺/CCR7⁺ и/или рецептор⁺/CD27⁺); и

(b) заполнение контейнера всей или частью композиции и необязательно другим раствором с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции, или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

85. Способ получения терапевтической композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток, способ, включающий заполнение контейнера всей или частью композиции Т-клеток, где композиция Т-клеток содержит Т-клетки, несущие рекомбинантный рецептор, который специфически связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или патологическим состоянием, с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и/или

определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

86. Способ получения терапевтической композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток, способ, включающий заполнение контейнера всей или частью композиции Т-клеток, где композиция Т-клеток содержит Т-клетки, несущие рекомбинантный рецептор, который специфически связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или патологическим состоянием, с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

87. Способ по любому из пп. 83-86, где стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или стандартная доза клеток содержит определенное количество CD4⁺/CCR7⁺-клеток.

88. Способ по любому из пп. 82-87, где:

стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно;

стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток; и/или

стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток.

89. Способ по любому из пп. 82-88, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или

приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

90. Способ по любому из пп. 82-89, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки; или по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки.

91. Способ по любому из пп. 82-90, где стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

92. Способ по любому из пп. 82-91, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют CD27 и/или CD45, необязательно, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих CD27⁺- или CD45RA⁺-клетки.

93. Способ по любому из пп. 82-92, дополнительно включающий оценку в терапевтической композиции количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CD27 и/или CD45RA, необязательно количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые представляют собой CD27⁺-клетки или CD45RA⁺-клетки.

94. Способ по п. 92 или п. 93, где стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и/или стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток.

95. Способ по любому из пп. 92-95, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки,

рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки.

96. Способ определения стандартной дозы подвергнутых инженерии Т-клеток для лечения индивидуума, где способ включает:

(а) оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CCR7⁺/CD27⁺);

(b) на основе количества, процентного содержания или отношения рецептор⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, определение одной или несколько стандартных доз клеток для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

97. Способ получения композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток, где способ включает:

(а) оценку в терапевтической композиции, содержащей множество CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, подвергнутых инженерии так чтобы экспрессировать рекомбинантный рецептор, количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CCR7⁺/CD27⁺); и

(b) заполнение контейнера всей или частью композиции и необязательно другим раствором с получением стандартной дозы композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

98. Способ получения терапевтической композиции, содержащей стандартную дозу композиции Т-клеток, способ, включающий заполнение контейнера всей или частью композиции Т-клеток, где композиция Т-клеток содержит Т-клетки, несущие рекомбинантный рецептор, который специфически связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или патологическим состоянием, с получением стандартной дозы

композиции Т-клеток, где стандартная доза содержит определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

99. Способ по любому из пп. 96-98, где стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или стандартная доза клеток содержит определенное количество CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

100. Способ по любому из пп. 96-99, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD8⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD8⁺-клетки), или CD4⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD4⁺-клетки), рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно; стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток; и/или стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

101. Способ по любому из пп. 96-100, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

102. Способ по любому из пп. 96-103, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток

в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки.

103. Способ по любому из пп. 96-102, где стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

104. Способ по любому из пп. 96-103, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют CD45, необязательно, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих CD45RA⁻-клетки.

105. Способ по любому из пп. 96-104, дополнительно включающий оценку в терапевтической композиции количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CD45RA, необязательно количества, процентного содержания или отношения Т-клеток, которые представляют собой CD45RA⁻-клетки.

106. Способ получения композиции клеток, содержащей подвергнутые генетической инженерии клетки, где способ включает:

i) получение из полученного у индивидуума биологического образца входящей композиции, содержащей требуемый процент CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемый процент CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA;

ii) внесение во входящую композицию полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор; и

iii) стимуляцию клеток во входящей композиции до, в течение и/или после указанного внесения, где стимуляция включает инкубацию клеток в присутствии одного или нескольких стимулирующих средств, где указанная стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток;

где способ позволяет получать выходящую композицию, содержащую определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

107. Способ получения композиции клеток, содержащей подвергнутые генетической инженерии клетки, где способ, включает внесение во входящую композицию полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, где входящая композиция содержит требуемый процент CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не

экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемый процент CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, получаемый из полученного у индивидуума биологического образца, и входящую композицию стимулируют до, в течение и/или после указанного внесения посредством инкубации клеток в присутствии одного или нескольких стимулирующих средств, где указанная стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток; и где способ позволяет получать выходящую композицию, содержащую определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

108. Способ получения композиции клеток, содержащей подвергнутые генетической инженерии клетки, где способ включает:

i) выделение из получаемого у индивидуума биологического образца требуемого количества CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемого количества CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, таким образом, получая входящую композицию;

ii) внесение во входящую композицию полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор; и

iii) стимуляцию клеток во входящей композиции до, в течение и/или после указанного внесения, где стимуляция включает инкубацию клеток в присутствии одного или нескольких стимулирующих средств, где указанная стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток;

где способ позволяет получать выходящую композицию, содержащую определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

109. Способ получения композиции клеток, содержащей подвергнутые генетической инженерии клетки, где способ, включает внесение во входящую композицию полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, где входящую композицию получают посредством выделения из получаемого у индивидуума биологического образца требуемого количества CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют

или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемого количества CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и входящую композицию стимулируют до, в течение и/или после указанного внесения посредством инкубации клеток в присутствии одного или нескольких стимулирующих средств, где указанная стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток; и где способ позволяет получать выходящую композицию, содержащую определенное отношение экспрессирующих рекомбинантный рецептор (рецептор⁺) CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или рецептор⁺/CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и другого подмножества клеток в композиции.

110. Способ по любому из пп. 106-109, где входящая композиция содержит требуемый процент CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или требуемый процент CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA.

111. Способ по любому из пп. 106-110, где входящая композиция содержит требуемый процент CD4⁺/CCR7⁺-, CD4⁺/CD27⁺-, CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-, CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-, CD8⁺/CCR7⁺-, CD8⁺/CD27⁺-, CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток.

112. Способ по любому из пп. 106-111, где выходящая композиция содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или- рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток; или

определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

113. Способ по любому из пп. 106-112, дополнительно включающий определение одной или нескольких стандартных доз композиции Т-клеток для введения индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием, где стандартная доза содержит всю или часть выходящей композиции, которая содержит:

определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют рецептор С-С хемокинов типа 7 (CCR7) (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих

рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции;

определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют кластер дифференцировки 27 (CD27) (рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции; или

определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CCR7 и CD27 (рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки), и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и другого подмножества клеток в композиции.

114. Способ по п. 113, где стандартная доза клеток содержит определенное количество CD8⁺/CCR7⁺-клеток, CD4⁺/CCR7⁺-клеток, CD8⁺/CD27⁺-клеток, CD4⁺/CD27⁺-клеток, CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

115. Способ по п. 113 или п. 114, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 , каждое включительно, рецептор⁺/CD8⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток.

116. Способ по любому из пп. 113-115, где:

стандартная доза всего содержит по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток; и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺; и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или по меньшей мере приблизительно 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток; и/или

стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток; и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, или стандартная доза всего содержит рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺, и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и/или точно или приблизительно от 3×10^6 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, точно или приблизительно от 4×10^6 до точно или приблизительно 2×10^7 , или точно или приблизительно от 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, каждое включительно.

117. Способ по любому из пп. 113-116, где:

по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клетки;

по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клетки; и/или

по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺- или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клетки.

118. Способ по любому из пп. 113-117, где стандартная доза клеток содержит определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1; и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, где это отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1; и/или определенное отношение рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток и рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, где это

отношение необязательно составляет или приблизительно составляет 1:1 или приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1.

119. Способ по любому из пп. 113-118, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих клетки, которые экспрессируют или не экспрессируют CD45, необязательно, где стандартная доза дополнительно содержит определенное количество клеток, содержащих CD45RA⁻-клетки.

120. Способ по п. 110, где стандартная доза клеток содержит определенное количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток.

121. Способ по любому из пп. 113-120, где по меньшей мере 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе или приблизительно от 15% до 90%, приблизительно от 20% до 80%, приблизительно от 30% до 70% или приблизительно от 40% до 60%, каждое включительно, всех рецептор⁺-клеток в стандартной дозе представляют собой рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻- или рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клетки.

122. Способ по любому из пп. 106-121, где перед предоставлением или выделением способ включает определение количества, количества на единицу объема, количества на единицу массы и/или процентного содержания CD8⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA, и/или CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют или не экспрессируют CCR7, CD27 и/или CD45RA.

123. Способ по любому из пп. 106-122, где одно или несколько стимулирующих средств способно к активации Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток и/или CD8⁺ Т-клеток; способно к индукции сигнала через комплекс TCR и/или способно к индукции пролиферации Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток и/или CD8⁺ Т-клеток.

124. Способ по любому из пп. 106-123, где одно или несколько стимулирующих средств содержит первичное средство, которое связывается с участником комплекса TCR, необязательно, которое специфически связывается с CD3.

125. Способ по п. 124, где одно или несколько стимулирующих средств дополнительно содержат вторичное средство, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой Т-клетки.

126. Способ по п. 125, где костимулирующая молекула выбрана из группы, состоящей из CD28, CD137 (4-1BB), OX40 или ICOS.

127. Способ по п.125 или п. 126, где первичное и вторичное средства содержат антитела, необязательно, где одно или несколько стимулирующих средств включают инкубацию с антителом к CD3 и антителом к CD28.

128. Способ по любому из пп. 106-127, где одно или несколько стимулирующих средств находятся на поверхности твердой подложки, необязательно гранулы.

129. Способ по любому из пп. 106-128, где одно или несколько стимулирующих средств выбраны из группы, состоящей из связывающих CD3 молекул; связывающих CD28 молекул; рекомбинантного IL-2; рекомбинантного IL-15 и рекомбинантного IL-7,

вакцины, содержащей антиген, специфически распознаваемый антигенным рецептором, и антиидиотипического антитела, которое специфически связывается с антигенным рецептором или их сочетаний.

130. Способ по любому из пп. 82-129, где терапевтическая композиция представляет собой композицию по п. 1 или п. 7.

131. Способы по любому из пп. 82-130, дополнительно включающий введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием терапевтической композиции, необязательно одной или нескольких ее стандартных доз и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам.

132. Способ по любому из пп. 82-131, где в группе индивидуумов, обработанных данным способом, количество или отношение клеток, которые экспрессируют CCR7 (CCR7⁺-клетки), в стандартной дозе варьирует не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5%.

133. Способ по любому из пп. 82-132, где стандартная доза всего содержит точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 , точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 CD3⁺-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/CD3⁺-клетки), или всех CD3⁺-клеток, каждое включительно; 82-и/или the стандартная доза всего содержит не более чем приблизительно 5×10^8 , не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/CD3⁺-клеток или всех CD3⁺-клеток.

134. Способ по любому из пп. 82-133, где общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые являются живыми или жизнеспособными.

135. Способ по любому из пп. 82-134, где общее количество CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD3⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD27⁺-клеток, общее количество рецептор⁺/CD8⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые являются живыми или жизнеспособными.

-клеток и/или рецептор⁺/CD4⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻-клеток представляет собой общее количество таких клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, и/или представляет собой общее количество таких клеток, которые негативны (-) по маркерам апоптоза, где маркеры апоптоза представляют собой аннексин V или активированную каспазу 3.

136. Способ по любому из пп. 131-135, включающий введение множества стандартных доз, содержащихся во множестве отдельных композиций.

137. Способ по п. 136, где множество отдельных композиций содержит первую композицию, содержащую одно из CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток, и вторую композицию, содержащую другое из CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток.

138. Способ по п. 137, где первая композиция содержит CD8⁺ Т-клетки.

139. Способ по п. 137, где первая композиция содержит CD4⁺ Т-клетки.

140. Способ по любому из пп. 131-139, включающий введение композиции, содержащей CD8⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, и композиции, содержащей CD4⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам с интервалом не более 48 часов.

141. Способ по п. 140, где композиция, содержащий CD8⁺ Т-клетки или одна или несколько ее стандартных доз и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам и композиция, содержащий CD4⁺ Т-клетки или одна или несколько ее стандартных доз и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам вводят с интервалом не более 36 часов, с интервалом не более 24 часов, с интервалом не более 12 часов, с интервалом не более 6 часов, с интервалом не более 4 часов, с интервалом не более 2 часов, с интервалом не более 1 часа или с интервалом не более 30 минут.

142. Способ по п. 140 или п. 141, где композицию, содержащую CD8⁺ Т-клетки или одну или несколько ее стандартных доз и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, и композицию, содержащую CD4⁺ Т-клетки или одну или несколько ее стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам вводят с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа, не более 30 минут, не более 15 минут, не более 10 минут или не более 5 минут или одновременно.

143. Способ по любому из пп. 136-142, включающий введение композиции, содержащей CD8⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, до введения композиции, содержащей CD4⁺-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или нескольким стандартным дозам.

144. Способ по любому из пп. 136-142, включающий введение композиции, содержащей CD4⁺ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем,

соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, до введения композиции, содержащей CD8⁺-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или нескольким стандартным дозам.

145. Способ по любому из пп. 49-144, где рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который ассоциирован с клетками или тканями, вовлеченными в заболевание, нарушение или патологическое состояние, специфичен к ним и/или экспрессирован на них.

146. Способ по п. 145, где заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль.

147. Способ по п. 145 или п. 146, где антиген-мишень выбран из интегрина $\alpha v \beta 6$ (интегрин $\alpha v \beta 6$), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидраза 9 (CA9, также известного как CAIX или G250), раковотестикулярного антигена, антигена рака/семенников 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), раковоэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, хемокинового лиганда с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфатпротеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогенов, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолата альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора IL-22 альфа (IL-22R α), рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13R α 2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, представителя А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антигена Льюиса Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белка мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, специфического антигена предстательной железы, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1

(ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), связанного с тирозинкиназой белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), связанного с тирозинкиназой белка 2 (TRP2, также известного как дофакромтаутомераза, дофакром-дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белка опухоли Вильмаса 1 (WT-1), специфичного для патогена или экспрессируемого на патогене антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

148. Способ по любому из пп. 49-147, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

149. Способ по любому из пп. 48-148, где рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и область внутриклеточной сигнализации, содержащая домен внутриклеточной сигнализации, и дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации.

150. Способ по п. 149, где антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его фрагмент, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент.

151. Способ по п. 150, где фрагмент содержит scFv.

152. Способ по любому из пп. 149-151, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит домен внутриклеточной сигнализации цепи CD3, необязательно цепи CD3-зета (CD3 ζ) или его сигнальную часть.

153. Способ по любому из пп. 149-152, где область внутриклеточной сигнализации дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен.

154. Способ по п. 153, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть.

155. Способ по п. 153 или п. 154, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальные части.

156. Способ по любому из пп. 153-155, где костимулирующий сигнальный домен расположен между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации.

157. Способ по любому из пп. 49-156, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, получаемые у индивидуума.

158. Способ по любому из пп. 49-157, где Т-клетки являются аутологичными для индивидуума.

159. Способ по любому из пп. 49-157, где Т-клетки являются аллогенными для индивидуума.

160. Способ по любому из пп. 157-179, где у индивидуума диагностирована злокачественная опухоль, необязательно, где злокачественная опухоль представляет собой лейкоз или лимфому.

161. Способ по п. 160, где индивидуум представляет собой индивидуума, у которого на момент получения клеток, идентифицирована высокая опухолевая нагрузка или известно о ее наличии.

162. Способ по п. 161, где:

у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если сумма продуктивных размеров (SPD) опухоли у индивидуума точно или приблизительно превышает 30 см^2 , 40 см^2 , 50 см^2 , 60 см^2 или 70 см^2 ; и/или

у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если содержание С-реактивного белка (CRP) в биологическом образце, необязательно образце сыворотки, полученной у индивидуума, точно или приблизительно превышает 5 миллиграмм на литр, 10 миллиграмм на литр, 15 миллиграмм на литр, 20 миллиграмм на литр, 25 миллиграмм на литр, 30 миллиграмм на литр, 40 миллиграмм на литр или 50 миллиграмм на литр.

163. Способ по п. 162, где у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если SPD опухоли у индивидуума точно или приблизительно превышает 50 см^2 .

164. Способ по п. 162 или п. 163, где у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если содержание CRP в биологическом образце точно или приблизительно превышает 20 миллиграмм на литр.

165. Выходящая композиция, получаемая способом по любому из пп. 106-164.

166. Стандартная доза, определяемая или получаемая способом по любому из пп. 82-164.

167. Фармацевтическая композиция, содержащая стандартная доза по п. 166.

168. Фармацевтическая композиция по п. 167, дополнительно содержащая фармацевтический носитель.

169. Способ лечения, включающий введение млекопитающему всей или части выходящей композиции по п. 165, стандартной дозы по п. 166 или фармацевтической композиции по п. 167 или п. 168.

170. Применение всей или части выходящей композиции по п. 165,, стандартной дозы по п. 166 или фармацевтической композиции по п. 167 или п. 168 для лечения злокачественной опухоли.

171. Применение всей или части выходящей композиции по п. 165,, стандартной дозы по п. 166 или фармацевтической композиции по п. 167 или п. 168 в производстве лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли.

172. Выходящая композиция по п. 165, стандартная доза по п. 166 или фармацевтическая композиция по п. 167 или п. 168 для применения в лечении злокачественной опухоли.

173. Терапевтическая композиция клеток, содержащая Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, который связывается с антигеном, где после стимуляции стимулирующим средством:

по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, способны к продукции цитокина, выбранного из интерлейкина 2 (IL-2) и/или TNF-альфа; и/или

по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа.

174. Терапевтическая композиция клеток по п. 173, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, способны к продукции цитокина, выбранного из интерлейкина 2 (IL-2) и/или TNF-альфа.

175. Терапевтическая композиция клеток по любому из пп. 173-174, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа.

176. Терапевтическая композиция клеток по любому из пп. 173-175, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции цитокинов интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа.

177. Терапевтическая композиция клеток по любому из пп. 173-176, где стимулирующее средство представляет собой неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство.

178. Терапевтическая композиция клеток по п. 177, где неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство представляет собой поликлональное стимулирующее средство.

179. Терапевтическая композиция клеток по любому из пп. 173-178, где неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее средство содержит РМА/иономицин, связывающее CD3 средство/связывающее CD28 средство, фитогемагглютинин (PHA) или конканавалин А (ConA).

180. Терапевтическая композиция клеток по любому из пп. 177-179, где неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство содержит РМА/иономицин.

181. Терапевтическая композиция клеток по любому из пп. 173-176, где стимулирующее средство специфически связывает рекомбинантный рецептор, необязательно, где стимулирующее средство представляет собой специфичный к антигену стимулирующий реагент и/или содержит антиген или его часть, специфически распознаваемые рекомбинантным рецептором.

182. Терапевтическая композиция клеток по любому из пп. 173-181, где продукцию цитокинов определяют посредством анализа внутриклеточных цитокинов.

183. Терапевтическая композиция клеток по любому из пп. 173-182, где композиция содержит по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности, необязательно дополнительно негативны по экспрессии CD45RA на поверхности.

184. Терапевтическая композиция клеток по любому из пп. 173-183, где Т-клетки представляют собой первичные клетки, получаемые у индивидуума.

185. Терапевтическая композиция клеток по п. 184, где у индивидуума диагностирована злокачественная опухоль, необязательно, где злокачественная опухоль представляет собой лейкоз или лимфому.

186. Терапевтическая композиция клеток по п. 185, где индивидуум представляет собой индивидуума, у которого на момент получения клеток, идентифицирована высокая опухолевая нагрузка или известно о ее наличии.

187. Терапевтическая композиция клеток по п. 186, где:

у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если сумма продуктивных размеров (SPD) опухоли у индивидуума точно или приблизительно превышает 30 см^2 , 40 см^2 , 50 см^2 , 60 см^2 или 70 см^2 ; и/или

у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если содержание С-реактивного белка (CRP) в биологическом образце, необязательно образце сыворотки, полученной у индивидуума, точно или приблизительно превышает 5 миллиграмм на литр, 10 миллиграмм на литр, 15 миллиграмм на литр, 20 миллиграмм на литр, 25 миллиграмм на литр, 30 миллиграмм на литр, 40 миллиграмм на литр или 50 миллиграмм на литр.

188. Терапевтическая композиция клеток по п. 187, где у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если SPD опухоли у индивидуума точно или приблизительно превышает 50 см^2 .

189. Терапевтическая композиция клеток по п. 187 или п. 188, где у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если содержание CRP в биологическом образце точно или приблизительно превышает 20 миллиграмм на литр.

190. Терапевтическая композиция клеток по любому из пп. 173-189, где терапевтическая композиция клеток обогащена $CD4^+$ Т-клетками и/или по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 97% всех рекомбинантный рецептор⁺-клеток в композиции с подвергнутыми инженерии составляющими, или приблизительно от 60% до 99%, приблизительно от 75% до 99%, приблизительно от 85% до 99% или приблизительно от 90% до 99%, каждое включительно, всех клеток в композиции представляют собой $CD4^+$ -клетки

191. Терапевтическая композиция клеток по любому из пп. 173-189, где терапевтическая композиция клеток обогащена $CD3^+$ Т-клетками, обогащена $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки и/или по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 97% всех рекомбинантный рецептор⁺-клеток в композиции с подвергнутыми инженерии составляющими, или приблизительно от 60% до 99%, приблизительно от 75% до 99%, приблизительно от 85% до 99% или приблизительно от 90% до 99%, каждое включительно, всех клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ -или $CD4^+$ - и $CD8^+$ -клетки.

192. Терапевтическая композиция клеток по п. 191, где терапевтическая композиция клеток содержит $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки с отношением $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки, которое приблизительно составляет от 1:3 до приблизительно 3:1, необязательно между приблизительно 1:2 и 2:1.

193. Терапевтическая композиция по любому из пп. 173-192, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный антигенный рецептор.

194. Терапевтическая композиция по любому из пп. 173-193, где рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который ассоциирован с клетками или тканями, вовлеченными в заболевание, нарушение или патологическое состояние, специфичен к ним и/или экспрессирован на них.

195. Терапевтическая композиция по п. 194, где заболевание, нарушение или патологическое состояние представляют собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль.

196. Терапевтическая композиция по п. 194 или п. 195, где антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

197. Терапевтическая композиция по любому из пп. 194-196, где антиген-мишень выбран из интегрина $\alpha v \beta 6$ (интегрин $\alpha v \beta 6$), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-Н3, B7-Н6, карбоангидраза 9 (CA9, также известного как CAIX или G250), раковотестикулярного антигена, антигена рака/семенников 1В (CTAG, также известного

как NY-ESO-1 и LAGE-2), раковоэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, хемокинового лиганда с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфатпротеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогенов, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолата альфа, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора IL-22 альфа (IL-22R α), рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13R α 2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, представителя А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антигена Льюиса Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белка мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, специфического антигена предстательной железы, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), связанного с тирозинкиназой белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), связанного с тирозинкиназой белка 2 (TRP2, также известного как дофакромтауомераза, дофакром-дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белка опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфичного для патогена или экспрессируемого на патогене антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

198. Терапевтическая композиция по любому из пп. 173-197, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не являющийся TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

199. Терапевтическая композиция по любому из пп. 173-198, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

200. Терапевтическая композиция по любому из пп. 173-199, где рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и область внутриклеточной сигнализации, содержащая домен внутриклеточной сигнализации.

201. Терапевтическая композиция по п. 200, где антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его фрагмент, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент.

202. Терапевтическая композиция по п. 201, где фрагмент содержит переменные области антитела, связанные гибким линкером.

203. Терапевтическая композиция по п. 201 или п. 202, где фрагмент содержит scFv.

204. Терапевтическая композиция по любому из пп. 200-203, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции сигнала первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

205. Терапевтическая композиция по любому из пп. 200-204, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит домен внутриклеточной сигнализации цепи CD3, необязательно цепи CD3-зета (CD3 ζ) или его сигнальную часть.

206. Терапевтическая композиция по любому из пп. 200-205, где рекомбинантный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации.

207. Терапевтическая композиция по любому из пп. 200-206, где область внутриклеточной сигнализации дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен.

208. Терапевтическая композиция по п. 207, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть.

209. Терапевтическая композиция по п. 207 или п. 208, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальные части.

210. Терапевтическая композиция по любому из пп. 207-209, где костимулирующий сигнальный домен расположен между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации.

211. Терапевтическая композиция по любому из пп. 173-210, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, получаемые у индивидуума.

212. Терапевтическая композиция по любому из пп. 173-211, где Т-клетки являются аутологичными для индивидуума.

213. Промышленное изделие, содержащее контейнер, содержащий терапевтическая композиция клеток по любому из пп. 173-212, и инструкции для введения индивидууму с

заболеванием или патологическим состоянием, терапевтическая композиция клеток, необязательно одна или несколько ее стандартных доз и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам.

214. Промышленное изделие по п. 213, где инструкции определяют введение множества стандартных доз, содержащихся во множестве отдельных композиций.

215. Промышленное изделие по п. 214, где множество отдельных композиций содержит первую композицию, содержащую терапевтическую композицию клеток, содержащих одно из $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток, и вторую композицию, содержащую другое из $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток, где указанная вторая композиция содержит клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор или рекомбинантный рецептор, специфичный к антигену или к клеткам, экспрессируемым при заболевании или патологическом состоянии, необязательно, где вторая композиция представляет собой композицию по любому из пп. 1-40.

216. Промышленное изделие по п. 215, где инструкции определяют введение композиции, содержащей $CD8^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, и композиции, содержащей $CD4^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам в пределах интервала не более 48 часов, в пределах интервала не более 36 часов, в пределах интервала не более 24 часов, в пределах интервала не более 12 часов, в пределах интервала не более 6 часов, в пределах интервала не более 2 часов, в пределах интервала не более 1 часа или одновременно.

217. Промышленное изделие по п. 215 или п. 216, где инструкции определяют введение композиции, содержащей $CD8^+$ Т-клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующий таким одной или нескольким стандартным дозам, до введения композиции, содержащей $CD4^+$ -клетки, или одну или несколько их стандартных доз, и/или объем, соответствующим таким одной или нескольким стандартным дозам.

218. Способ лечения, способ включающий введение индивидууму с заболеванием или патологическим состоянием одной или нескольких стандартных доз терапевтической композиции клеток по любому из пп. 173-212.

219. Способ по п. 218, где терапевтическая композиция представляет собой первую терапевтическую композицию клеток, содержащую одно из $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток и одна или несколько единиц дозы дополнительно содержат вторую терапевтическую композицию клеток, содержащую другое из $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ -клеток, где указанная вторая композиция содержит клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор или рекомбинантный рецептор, специфичный к антигену или к клеткам, экспрессируемым при заболевании или патологическом состоянии, необязательно, где вторая композиция представляет собой композицию по любому из пп. 173-212.

220. Способ по п. 47, где по меньшей мере или приблизительно или точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток во второй терапевтической композиции клеток или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности, необязательно дополнительно негативны по экспрессии CD45RA на поверхности.

221. Способ по п. 219 или п. 220, где вторая терапевтическая композиция клеток обогащена CD8⁺ Т-клетками и/или по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95%, по меньшей мере или приблизительно 97% всех рекомбинантный рецептор⁺-клеток в композиции с подвергнутыми инженерии составляющими, или приблизительно от 60% до 99%, приблизительно от 75% до 99%, приблизительно от 85% до 99% или приблизительно от 90% до 99%, каждое включительно, всех клеток в композиции представляют собой CD8⁺-клетки

222. Способ по п. 221, где первую терапевтическую композицию и вторую терапевтическую композицию вводят в пределах точно или приблизительно 48 часов, в пределах точно или приблизительно 36 часов, в пределах точно или приблизительно 24 часа, в пределах точно или приблизительно 12 часов, в пределах точно или приблизительно 6 часов, в пределах точно или приблизительно 2 часов или в пределах точно или приблизительно 1 часа друг от друга.

223. Способ по п. 221 или п. 222, где вторую терапевтическую композицию клеток, содержащую CD8⁺ Т-клетки, вводят до первой композиции, содержащей CD4⁺ Т-клетки.

224. Способ по любому из пп. 218-223, где одна или несколько стандартная доза клеток содержит определенное отношение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, где это отношение составляет или составляет приблизительно 1:3 и приблизительно 3:1, необязательно, оно составляет или составляет приблизительно 1:2 и 2:1, необязательно, оно составляет или составляет приблизительно 1:1.

225. Способ лечения индивидуума, где способ включает:

(А) оценку композиции с подвергнутыми инженерии клетками, содержащей Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор на признак, указывающий на функцию или фенотип подвергнутых инженерии клеток в композиции, где признак выбран из (i) процентного содержания Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности, и необязательно негативны по CD45RA на поверхности; и/или (ii) процентного содержания CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые способны к продукции IL-2, TNF-альфа и/или IFN-гамма после стимуляции стимулирующим средством; и

(В) введение индивидууму с заболеванием или патологическим терапевтического средства, где введение выбрано из:

(1) если признак, указывающий на функцию или фенотип клеток композиции с подвергнутыми инженерии Т-клетками, находится на пороговом значении или превышает его, введение индивидууму одной или нескольких стандартных доз клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками, содержащей Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор; или

(2) если признак, указывающий на функцию или фенотип клеток композиции с подвергнутыми инженерии Т-клетками находится ниже порогового значения признака, проведение терапии, выбранной из (а) одной или нескольких стандартных доз клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками и средства, способного усилить рост, пролиферацию или эффективность Т-клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками у индивидуума, (b) увеличенной дозы клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками, необязательно увеличенной по сравнению с одной или несколькими стандартными дозами, вводимыми индивидууму в тех же условиях с тем же заболеванием или патологическим состоянием, но демонстрирующему пороговое значение признака или более; или (с) альтернативного терапевтического средства для лечения заболевания или патологического состояния, отличного от одной или нескольких стандартных доз композиции с подвергнутыми инженерии клетками,

где пороговое значение признака выбрано из

(i) точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности; и/или

(ii) точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, способны к продукции интерлейкина 2 (IL-2) или TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством; и/или

(iii) точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством.

226. Способ лечения индивидуума, способ включающий введение индивидууму с заболеванием или патологическим терапевтического средства, где введение выбрано из:

(1) если признак, указывающий на функцию или фенотип клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками, содержащей Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, находится на пороговом значении или превышает его, введение индивидууму одной или нескольких стандартных доз клеток композиции с подвергнутыми инженерии Т-клетками; или

(2) если признак, указывающий на функцию или фенотип клеток композиции с подвергнутыми инженерии Т-клетками, находится ниже порогового значения признака,

проведение терапии, выбранной из (а) одной или нескольких стандартных доз клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками и средства, способного усилить рост, пролиферацию или эффективность Т-клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками у индивидуума, (b) увеличенной дозы клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками, необязательно увеличенной по сравнению с одной или несколькими стандартными дозами, вводимыми индивидууму в тех же условиях с тем же заболеванием или патологическим состоянием, но демонстрирующему пороговое значение признака или более; или (с) альтернативного терапевтического средства для лечения заболевания или патологического состояния, отличного от дозы композиции с подвергнутыми инженерии клетками,

где пороговое значение признака выбрано из

(i) точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности; и/или

(ii) точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, способны к продукции интерлейкина 2 (IL-2) или TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством; и/или

(iii) точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством.

227. Способ по любому из пп. 218-226, где клетки композиции клеток являются аутологичными для индивидуума.

228. Способ по любому из пп. 218-227, где по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% или по меньшей мере 75% индивидуумов, обработанных данным способом, достигают продолжительности жизни без прогрессирования в течение по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев после введения одной или нескольких стандартных доз.

229. Способ по любому из пп. 218-228, где по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% или по меньшей мере 75% индивидуумов, обработанных данным способом, не происходит прогрессирования заболевания в течение по меньшей мере или приблизительно 3 месяцев, по меньшей мере или приблизительно 4 месяцев, по меньшей мере или приблизительно 5 месяцев, по меньшей мере или приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере или

приблизительно 9 месяцев или по меньшей мере или приблизительно 12 месяцев после введения одной или нескольких стандартных доз.

230. Способ по любому из пп. 218-229, где индивидуумы, обработанные данным способом, достигают фармакокинетического свойства клеток композиции клеток в биологическом образце, необязательно крови или образце сыворотки, которое в среднем улучшается по сравнению с группой находящихся в тех же условиях индивидуумов с тем же заболеванием или патологическим состоянием и с введением сходной дозы аутологичной композиции клеток, содержащей Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, но у которых признак, указывающий на функцию или фенотип клеток находится ниже порогового значения.

231. Способ по п. 230, где фармакокинетическое свойство представляет собой общее воздействие в течение времени (AUC) или пиковое количество клеток в биологическом образце.

232. Способ прогноза вероятности ответа на композицию терапевтических Т-клеток, где способ включает:

(а) оценку композиции с подвергнутыми инженерии клетками, содержащей Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор на признак, указывающий на функцию или фенотип подвергнутых инженерии клеток в композиции, где признак выбран из (i) процентного содержания Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности, и необязательно негативны по CD45RA на поверхности; и/или (ii) процентного содержания CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые способны к продукции IL-2, TNF-альфа и/или IFN-гамма после стимуляции стимулирующим средством; и

(b) определение вероятности ответа после введения клеточного терапевтического средства, содержащего дозу подвергнутых инженерии клеток, где, если признак находится на пороговом значении или превышает его, индивидуума определяют как имеющего большую вероятность достижения длительного ответа или увеличенной продолжительности жизни без прогрессирования, необязательно в течение по меньшей мере 3 месяцев после введения терапевтического средства; или, если признак находится ниже порогового значения, индивидуума определяют как имеющего небольшую вероятность продемонстрировать длительный ответ или продолжительность жизни без прогрессирования на терапию,

где пороговое значение признака выбрано из:

(i) точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности; и/или

(ii) точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества CD4⁺ Т-клеток в композиции,

экспрессирующих рекомбинантный рецептор, способны к продукции интерлейкина 2 (IL-2) или TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством; и/или

(iii) точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества $CD4^+$ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством.

233. Способ по п. 232, где клетки композиции клеток являются аутологичными для индивидуума.

234. Способ по п. 232 или п. 233, где, если индивидуум определен как имеющий большую вероятность достижения длительного ответа или увеличенной продолжительности жизни без прогрессирования при введении терапевтического средства, введение индивидууму одной или нескольких стандартных доз клеток композиции с подвергнутыми инженерии Т-клетками.

235. Способ по любому из пп. 218-231, 233 и 234, где одна или несколько стандартных доз всего содержат точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 , точно или приблизительно от 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 , точно или приблизительно от 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 , или точно или приблизительно от 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 всех Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (рецептор⁺/Т-клетки), или всех Т-клеток, каждое включительно.

236. Способ по любому из пп. 218-231 и 233-235, где одна или несколько стандартных доз всего содержат не более чем приблизительно 5×10^8 , не более чем приблизительно 1×10^8 , не более чем приблизительно 5×10^7 , не более чем приблизительно 1×10^7 , не более чем приблизительно 5×10^6 , не более чем приблизительно 1×10^6 , или не более чем приблизительно 5×10^5 рецептор⁺/Т-клеток или всех Т-клеток.

237. Способ по любому из пп. 225-236, где пороговым значением признака является, что точно или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивны по CCR7 и/или CD27 на поверхности; и/или

238. Способ по любому из пп. 225-237, где пороговым значением признака является, что точно или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества $CD4^+$ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, способны к продукции цитокина, выбранного из интерлейкина 2 (IL-2) и/или TNF-альфа.

239. Способ по любому из пп. 225-238, где пороговым значением признака является, что точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества $CD4^+$ Т-клеток в композиции, экспрессирующих

рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа.

240. Способ по любому из пп. 225-239, где пороговым значением признака является, что точно или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества $CD4^+$ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции цитокинов интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа.

241. Способ по любому из пп. 232-240, где, если индивидуума определяют, как имеющего небольшую вероятность достижения длительного ответа или увеличенной продолжительности жизни без прогрессирования, введение индивидууму терапевтического средства, выбранного из (а) дозы клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками и средства, способного усилить рост, пролиферацию или эффективность Т-клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками у индивидуума, (b) увеличенной дозы клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками, необязательно увеличенной по сравнению с дозой, вводимой находящемуся в таких же условиях индивидууму с тем же заболеванием или патологическим состоянием, но имеющему большую вероятность достижения продолжительности жизни без прогрессирования или длительного ответа на клеточное терапевтическое средство; или (с) альтернативного терапевтического средства для лечения заболевания или патологического состояния, отличного от дозы композиции с подвергнутыми инженерии клетками.

242. Способ по любому из пп. 225-231 и 241, где способ включает введение терапевтического средства, содержащего дозу клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками и средство, способного усилить рост, пролиферацию или эффективность Т-клеток композиции с подвергнутыми инженерии клетками у индивидуума, где средство представляет собой антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфичный к CAR, ингибитор контрольной точки иммунного ответа, модулятор метаболического пути, антагонист рецепторов аденозина, ингибитор киназы, антитело к $TGF\beta$ или антитело к $TGF\beta R$ или цитокин.

243. Способ по п. 242, где средство вводят до введения композиции терапевтических Т-клеток, одновременно с ним или после него.

244. Способ по любому из пп. 218-242, где индивидуум представляет собой индивидуума, у которого на момент оценки и/или до введения была определена высокая опухолевая нагрузка или было известно о ее наличии.

245. Способ по п. 244, где:

у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если сумма продуктивных размеров (SPD) опухоли у индивидуума точно или приблизительно превышает 30 см^2 , 40 см^2 , 50 см^2 , 60 см^2 или 70 см^2 ; и/или

у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если содержание С-реактивного белка (CRP) в биологическом образце, необязательно образце сыворотки,

полученной у индивидуума, точно или приблизительно превышает 5 миллиграмм на литр, 10 миллиграмм на литр, 15 миллиграмм на литр, 20 миллиграмм на литр, 25 миллиграмм на литр, 30 миллиграмм на литр, 40 миллиграмм на литр или 50 миллиграмм на литр.

246. Способ по п. 245, где у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если SPD опухоли у индивидуума точно или приблизительно превышает 50 см².

247. Способ по п. 245 или п. 246, где у индивидуума определяют высокую опухолевую нагрузку, если содержание CRP в биологическом образце точно или приблизительно превышает 20 миллиграмм на литр.

248. Способ по любому из пп. 225-247, где стимулирующее средство представляет собой неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство.

249. Способ по п. 248, где неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство представляет собой поликлональное стимулирующее средство.

250. Способ по любым из п. 248 или п. 249, где неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее средство содержит РМА/иономицин, связывающее CD3 средство/связывающее CD28 средство, фитогемагглютинин (РНА) или конканавалин А (ConA).

251. Способ по любому из пп. 248-250, где неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство содержит РМА/иономицин.

252. Способ по любому из пп. 225-247, где стимулирующее средство специфически связывает рекомбинантный рецептор, необязательно, где стимулирующее средство представляет собой специфичный к антигену стимулирующий реагент и/или содержит антиген или его часть, специфически распознаваемые рекомбинантным рецептором.

253. Способ по любому из пп. 225-252, где продукцию цитокинов определяют посредством анализа внутриклеточных цитокинов.

254. Способ по любому из пп. 218-253, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный антигенный рецептор.

255. Способ по любому из пп. 218-254, где рекомбинантный рецептор способен связывать антиген-мишень, который ассоциирован с клетками или тканями, вовлеченными в заболевание, нарушение или патологическое состояние, специфичен к ним и/или экспрессирован на них.

256. Способ по п. 255, где заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или злокачественную опухоль.

257. Способ по п. 255 или п. 256, где антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген.

258. Способ по любому из пп. 255-257, где антиген-мишень выбран из интегрина $\alpha\upsilon\beta6$ (интегрин $\alpha\upsilon\beta6$), антигена созревания В-клеток (BCMA), В7-Н3, В7-Н6, карбоангидраза 9 (CA9, также известного как CAIX или G250), раковотестикулярного антигена, антигена рака/семенников 1В (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-

2), раковоэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, хемокинового лиганда с мотивом C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфатпротеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогенов, подобного Fc-рецептору белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог Fc-рецептора 5 или FCRH5), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолата альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора IL-22 альфа (IL-22R α), рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13R α 2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, представителя А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8 (LRRC8A), антигена Льюиса Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов представителя В группы 2 естественных киллеров (NKG2D), белка мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, специфического антигена предстательной железы, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG также известного как 5T4), опухоль-ассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), связанного с тирозинкиназой белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), связанного с тирозинкиназой белка 2 (TRP2, также известного как дофахромтауомераза, дофахром-дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), белка опухоли Вильмаса 1 (WT-1), специфичного для патогена или экспрессируемого на патогене антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессируемых ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

259. Способ по любому из пп. 218-258, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не являющийся TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

260. Способ по любому из пп. 218-259, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

261. Способ по любому из пп. 218-260, где рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и область внутриклеточной сигнализации, содержащую домен внутриклеточной сигнализации.

262. Способ по п. 261, где антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или его фрагмент, который необязательно представляет собой одноцепочечный фрагмент.

263. Способ по п. 262, где фрагмент содержит переменные области антитела, связанные гибким линкером.

264. Способ по п. 262 или п. 263, где фрагмент содержит scFv.

265. Способ по любому из пп. 261-264, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен к индукции сигнала первичной активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

266. Способ по п. 265, где домен внутриклеточной сигнализации представляет собой или содержит домен внутриклеточной сигнализации цепи CD3, необязательно цепи CD3-зета (CD3 ζ) или его сигнальную часть.

267. Способ по любому из пп. 261-266, где рекомбинантный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и областью внутриклеточной сигнализации.

268. Способ по любому из пп. 261-267, где область внутриклеточной сигнализации дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен.

269. Способ по п. 268, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть.

270. Способ по п. 268 или п. 269, где костимулирующий сигнальный домен содержит домен внутриклеточной сигнализации CD28, 4-1BB или ICOS или их сигнальные части.

271. Способ по п. 269 или п. 270, где костимулирующий сигнальный домен расположен между трансмембранным доменом и доменом внутриклеточной сигнализации.

272. Способ по любому из пп. 218-271, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, получаемые у индивидуума.

273. Способ по любому из пп. 218-272, где Т-клетки являются аутологичными для индивидуума.

274. Способ получения композиции терапевтических Т-клеток, включающий:

(а) инкубацию входящей композиции в стимулирующих условиях с получением, таким образом, стимулированной композиции, где входящая композиция, содержащая определенное количество Т-клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза, (негативные по маркерам апоптоза ()); и

(b) введение рекомбинантного рецептора в клетки из стимулированной композиции с получением, таким образом, композиции с подвергнутыми инженерии клетками, где введение содержит приведение клеток стимулированной композиции в контакт со средством, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

275. Способ по п. 274, где негативные по маркерам апоптоза Т-клетки представляют собой или содержат негативные по маркерам апоптоза CD3⁺-клетки, негативные по маркерам апоптоза CD8⁺-клетки, негативные по маркерам апоптоза CD4⁺-клетки или негативные по маркерам апоптоза CD8⁺-клетки и негативные по маркерам апоптоза CD4⁺-клетки.

276. Способ по п. 274 или п. 275, где маркер апоптоза представляет собой аннексин V.

277. Способ по п. 274 или п. 275, где маркер апоптоза представляет собой активированную каспазу 3.

278. Способ по любым из п. 274-276, где определенное количество Т-клеток содержит по меньшей мере 50×10^6 негативных по маркерам апоптоза Т-клеток, необязательно негативных по маркерам апоптоза CD4⁺- и/или негативных по маркерам апоптоза CD8⁺ Т-клеток.

279. Способ по любому из пп. 274-278, где определенное количество Т-клеток содержит по меньшей мере 100×10^6 негативных по маркерам апоптоза Т-клеток, необязательно негативных по маркерам апоптоза CD4⁺- и/или негативных по маркерам апоптоза CD8⁺ Т-клеток.

280. Способ по любому из пп. 274-279, где определенное количество Т-клеток содержит точно или приблизительно от 100×10^6 до точно или приблизительно 500×10^6 негативных по маркерам апоптоза Т-клеток, необязательно негативных по маркерам апоптоза CD4⁺- и/или негативных по маркерам апоптоза CD8⁺ Т-клеток.

281. Способ по любому из пп. 274-280, где определенное количество Т-клеток содержит точно или приблизительно 300×10^6 негативных по маркерам апоптоза Т-клеток, необязательно негативных по маркерам апоптоза CD4⁺- и/или негативных по маркерам апоптоза CD8⁺-Т-клеток.

282. Способ по любому из пп. 274-281, где процентное содержание негативных по маркерам апоптоза Т-клеток такое как процентное содержание всех Т-клеток во входящей композиции составляет более чем или более чем приблизительно 70%, более чем или более чем приблизительно 80%, более чем или более чем приблизительно 90% или более чем или более чем приблизительно 95%.

283. Способ по любому из пп. 274-282, где перед инкубацией, получают входящую композицию, содержащую определенное количество негативных по маркерам апоптоза Т-клеток.

284. Способ по любому из пп. 274-283, где перед инкубацией, выделением, отбором или обогащением негативные по маркерам апоптоза Т-клетки, необязательно

негативные по маркерам апоптоза CD4⁺ и/или негативные по маркерам апоптоза CD8⁺ Т-клетки из биологического образца.

285. Способ получения композиции терапевтических Т-клеток, где способ включает:

(а) выделение, отбор или обогащение с использованием биологического образца, популяции Т-клеток, которые не экспрессируют маркеров апоптоза (негативные по маркерам апоптоза ()), необязательно негативных по маркерам апоптоза CD4⁺ и/или негативных по маркерам апоптоза CD8⁺ Т-клеток с получением, таким образом, входящей композиции.

(b) инкубацию входящей композиции в стимулирующих условиях с получением, таким образом, стимулированной композиции; и

(с) введение рекомбинантного рецептора в клетки из стимулированной композиции с получением, таким образом, композиции с подвергнутыми инженерии клетками, где введение содержит приведение клеток стимулированной композиции в контакт со средством, содержащим полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

286. Способ п. 284 или п. 285, где биологический образец первичных Т-клеток получают у индивидуума.

287. Способ по п. 286, где индивидуум представляет собой человека.

288. Способ по любому из пп. 284-287, где биологический образец представляет собой или содержит образец цельной крови, образец лейкоцитарного слоя, образец моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), образец нефракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкоафереза.

289. Способ по любому из пп. 284-288, где биологический образец содержит продукт афереза или продукт лейкоафереза.

290. Способ по любому из пп. 284-289, где Т-клетки выделяют, отбирают или обогащают с использованием биологического образца не более чем через 36 часов после его получения у индивидуума.

291. Способ по любому из пп. 284-289, где биологический образец подвергают криообработке в присутствии криопротектора не более чем через 36 часов после его получения у индивидуума и размораживают перед выделением, отбором или обогащением клеток, необязательно, где подвергнутый криообработке образец размораживают непосредственно перед или в интервале не более 6 часов, не более 4 часов, не более 2 часов или не более 1 часа перед выделением, отбором или обогащением клеток.

292. Способы по любому из пп. 274-291, где инкубацию проводят в присутствии одного или нескольких цитокинов, необязательно в среде без сыворотки.

293. Способы по п. 292, где один или несколько цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

294. Способ по п. 293, 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.

295. Способ по любому из пп. 274-294, где стимулирующий реагент содержит первичное средство, которое специфически связывается с участником комплекса TCR, необязательно, которое специфически связывается с CD3, необязательно, где первичное средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

296. Способ по п. 295, где стимулирующий реагент дополнительно содержит вторичное средство, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой Т-клетки, необязательно, где костимулирующая молекула выбрана из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS, необязательно, где вторичные средства представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

297. Способ по любому из пп. 274-296, где стимулирующий реагент включает инкубацию с антителом к CD3 и антителом к CD28 или их антигенсвязывающими фрагментами.

298. Способ по любому из пп. 295-297, где первичное средство и/или вторичные средства находятся на поверхности твердой подложки.

299. Способ по п. 298, где твердая подложка представляет собой или содержит гранулу.

300. Способ по любому из пп. 295-299, где первичное средство и вторичные средства иммобилизованы или обратимо связаны на поверхности реагента олигомерных частиц, содержащих множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина

301. Способы по любому из пп. 274-300, где входящую композицию инкубируют в стимулирующих условиях в течение периода от 12 часов до 36 часов, включительно, необязательно точно или приблизительно 24 часа.

302. Способ по любому из пп. 274-301, где контактирование проводят посредством вирусной трансдукции, необязательно с использованием ретровирусного вектора, необязательно лентивирусного вектора.

303. Способ по любому из пп. 274-302, дополнительно, включающий культивирование композиции с подвергнутыми инженерии составляющими в условиях, способствующих пролиферации и/или росту подвергнутых инженерии клеток, таким образом, получая выходящую композицию, содержащую подвергнутые инженерии Т-клетки.

304. Способ по п. 303, где культивирование проводят в присутствии одного или нескольких цитокинов, необязательно в среде без сыворотки.

305. Способ по п. 304, где один или несколько цитокинов выбраны из рекомбинантного IL-2, рекомбинантного IL-7 и/или рекомбинантного IL-15.

306. Способ по п. 304 или 305, где один или несколько цитокинов содержат: 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.

307. Способ по любому из пп. 274-306, где:

входящая композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки и $CD8^+$ Т-клетки в отношении $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток от 2:1 до 1:2; или

входящая композиция содержит негативные по маркерам апоптоза $CD4^+$ Т-клетки и негативные по маркерам апоптоза $CD8^+$ Т-клетки в отношении $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток от 2:1 до 1:2.

308. Способ по п. 307, где $CD4^+$ Т-клетки и $CD8^+$ Т-клетки отдельно отбирают, выделяют или обогащают с использованием одного и того же биологического образца или образца из него и комбинируют до инкубации.

309. Способ по любому из пп. 274-308, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

310. Способ по любому из пп. 303-309, где выходящая композиция содержит:

по меньшей мере или приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества Т-клеток в композиции или общего количества Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, позитивных по CCR7 и/или CD27 на поверхности; и/или

по меньшей мере или приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% общего количества $CD4^+$ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, способных к продукции интерлейкина 2 (IL-2) или TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством; и/или

по меньшей мере или приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более общего количества $CD4^+$ Т-клеток в композиции, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, являются полифункциональными по продукции двух или более цитокинов выбранных из интерферона-гамма (IFN-гамма), интерлейкина 2 (IL-2) и TNF-альфа после стимуляции стимулирующим средством.

311. Способ по п. 310, где стимулирующее средство представляет собой неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство.

312. Способ по п. 311, где неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство представляет собой поликлональное стимулирующее средство.

313. Способ по п. 311 или п. 312, где неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее средство содержит РМА/иономицин, связывающее CD3 средство/связывающее CD28 средство, фитогемагглютинин (РНА) или конканавалин А (ConA).

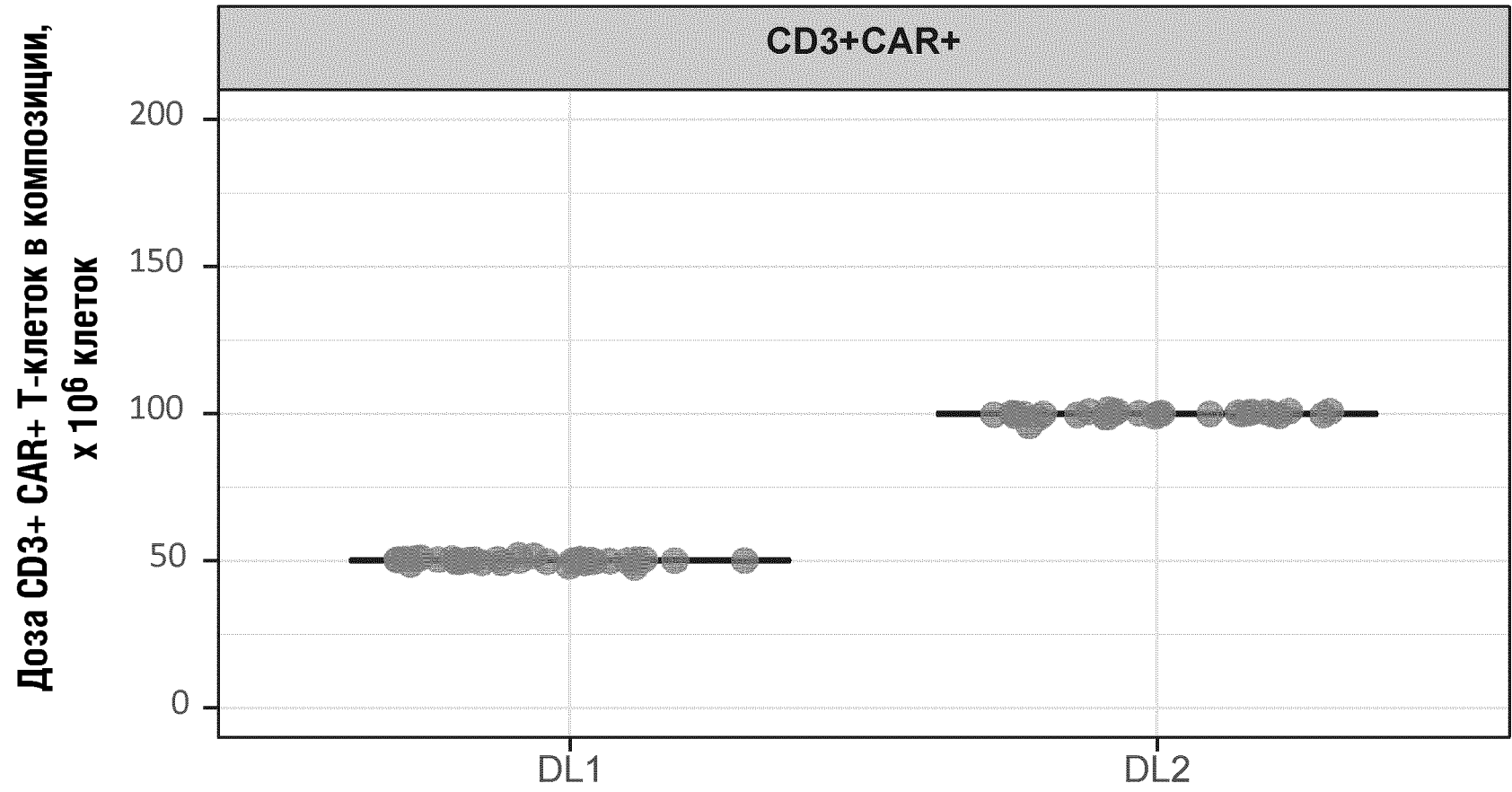
314. Способ по любому из пп. 311-313, где неспецифическое или независимое от антигена стимулирующее Т-клетки средство содержит РМА/иономицин.

315. Способ по п. 310, где стимулирующее средство специфически связывает рекомбинантный рецептор, необязательно, где стимулирующее средство представляет собой специфичный к антигену стимулирующий реагент и/или содержит антиген или его часть, специфически распознаваемые рекомбинантным рецептором.

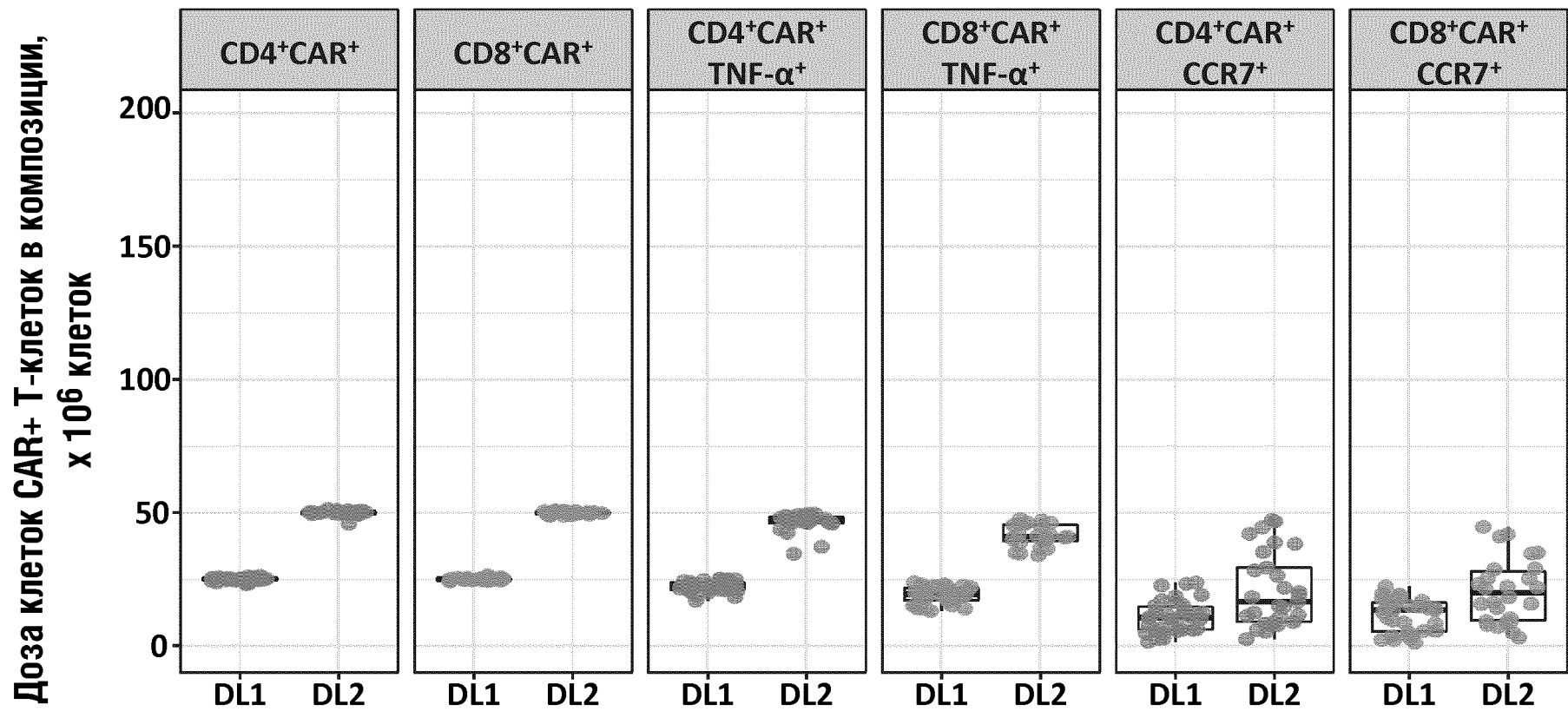
316. Способ по любому из пп. 310-315, где продукцию цитокинов определяют посредством анализа внутриклеточных цитокинов.

По доверенности

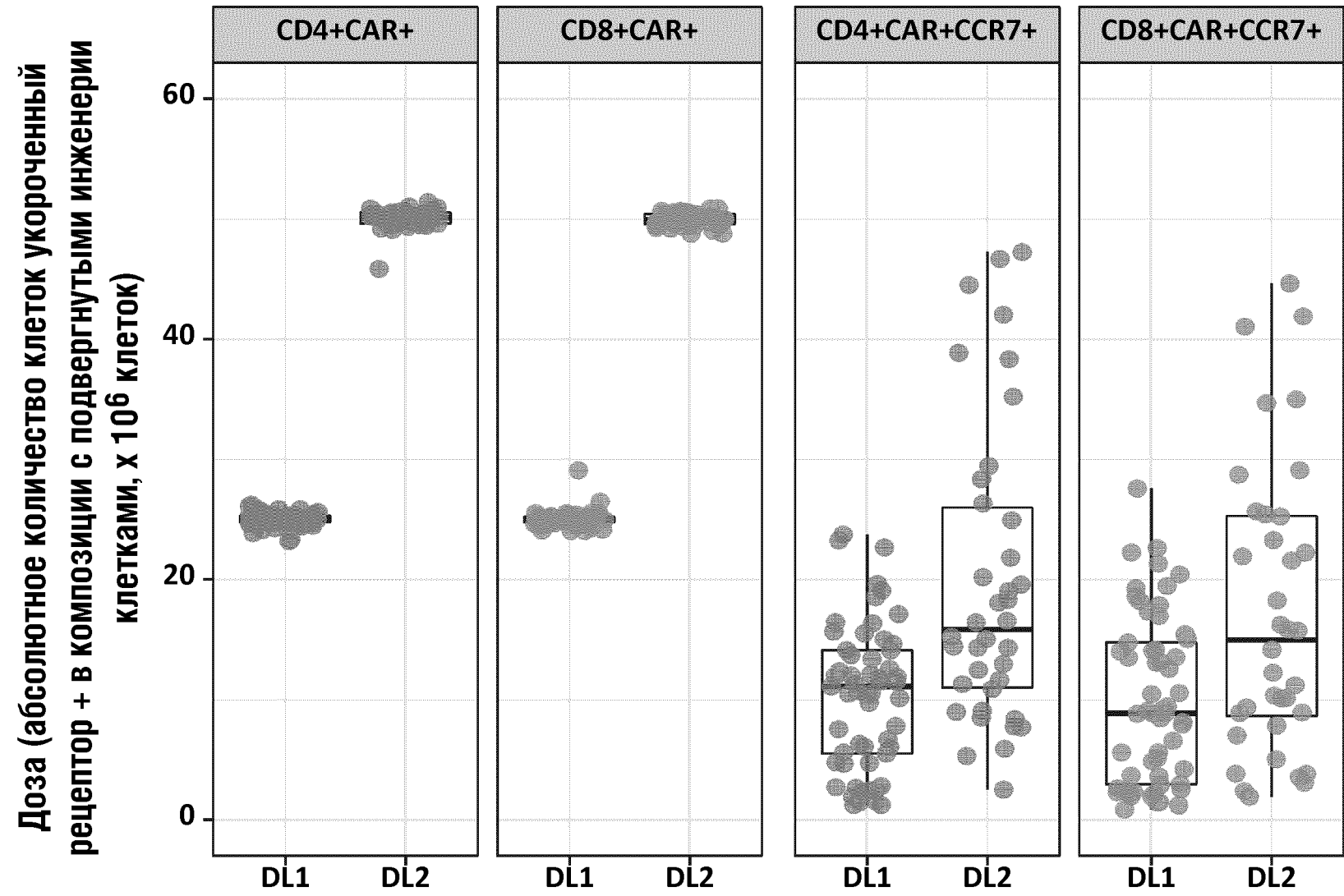
ФИГ.1А



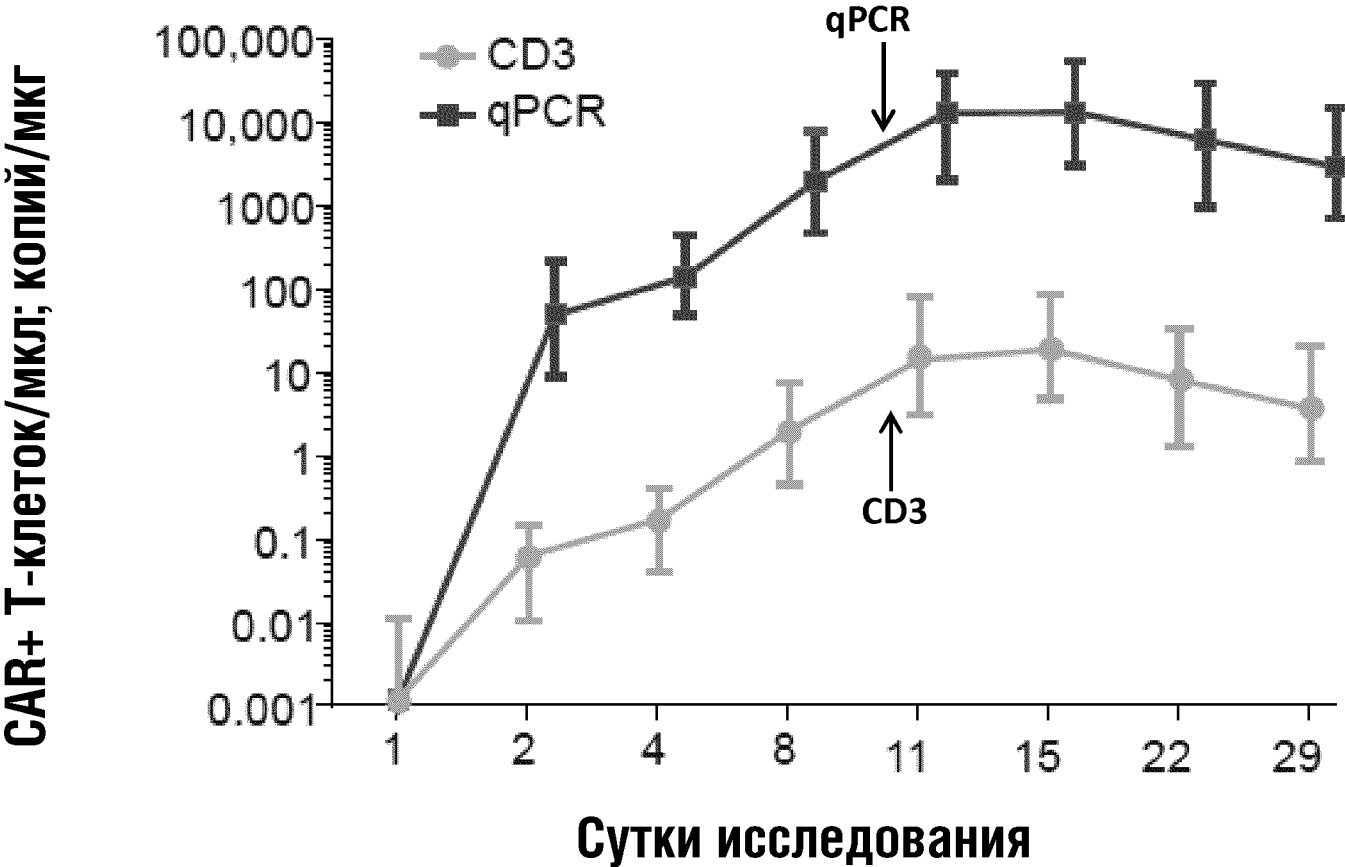
ФИГ.1В



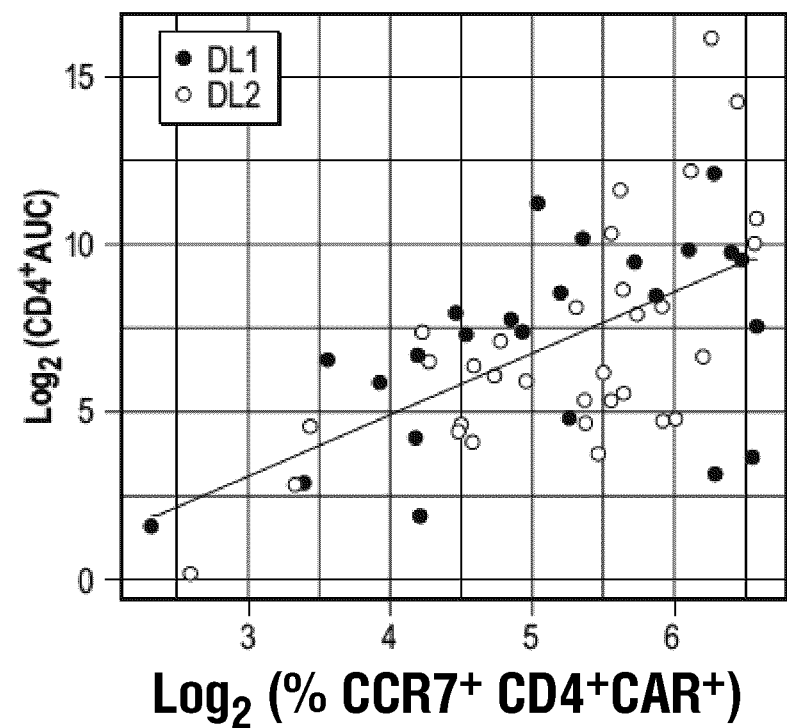
ФИГ.1С



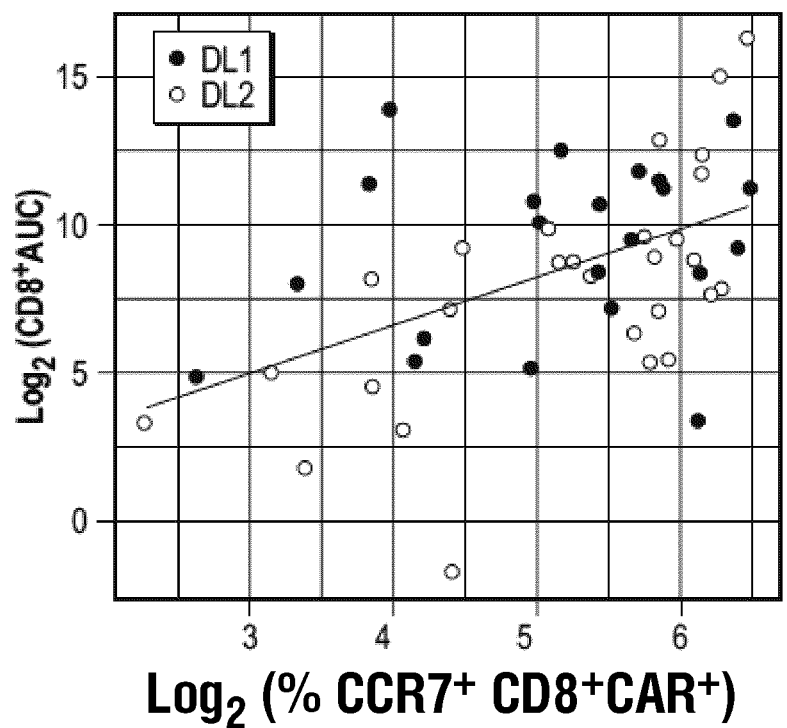
ФИГ.2



ФИГ.3А

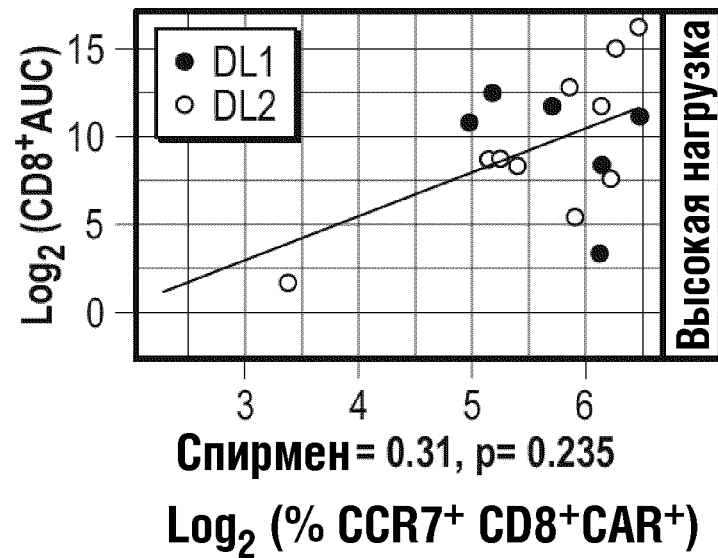
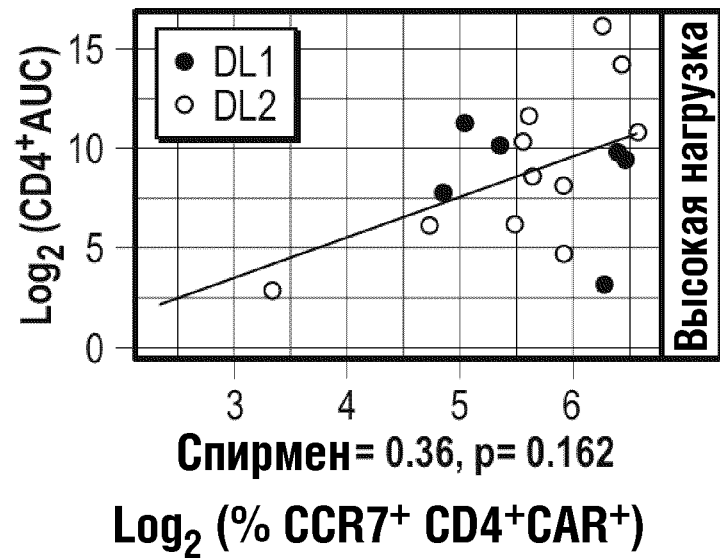
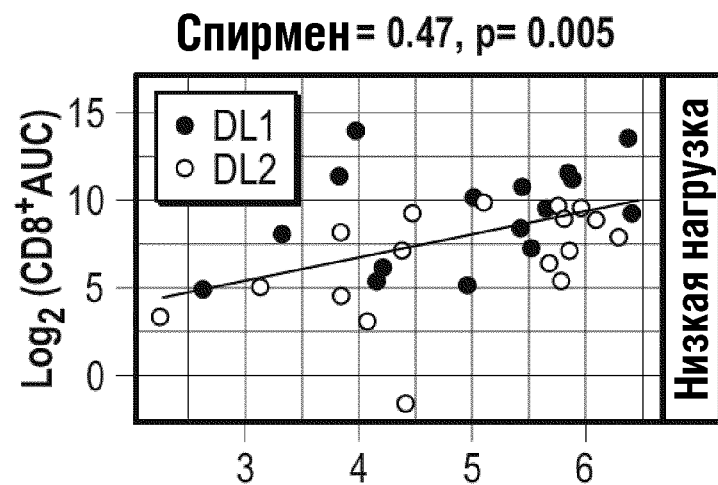
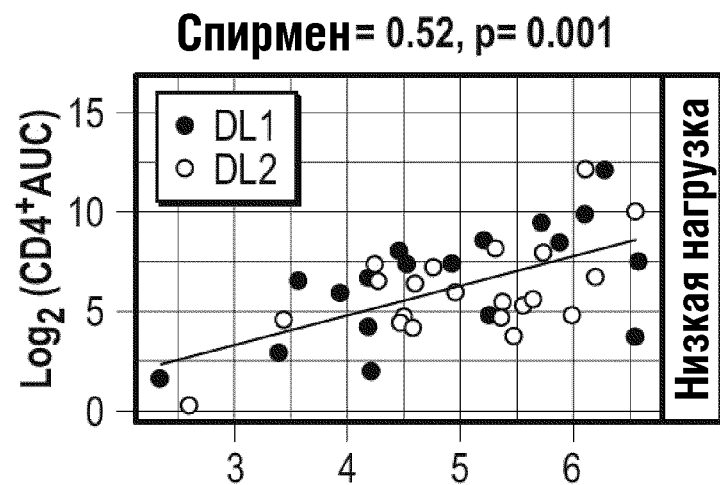


	значение P	Коэффициент
Спирмен	<.0001	0.52
Пирсон	<.0001	0.58

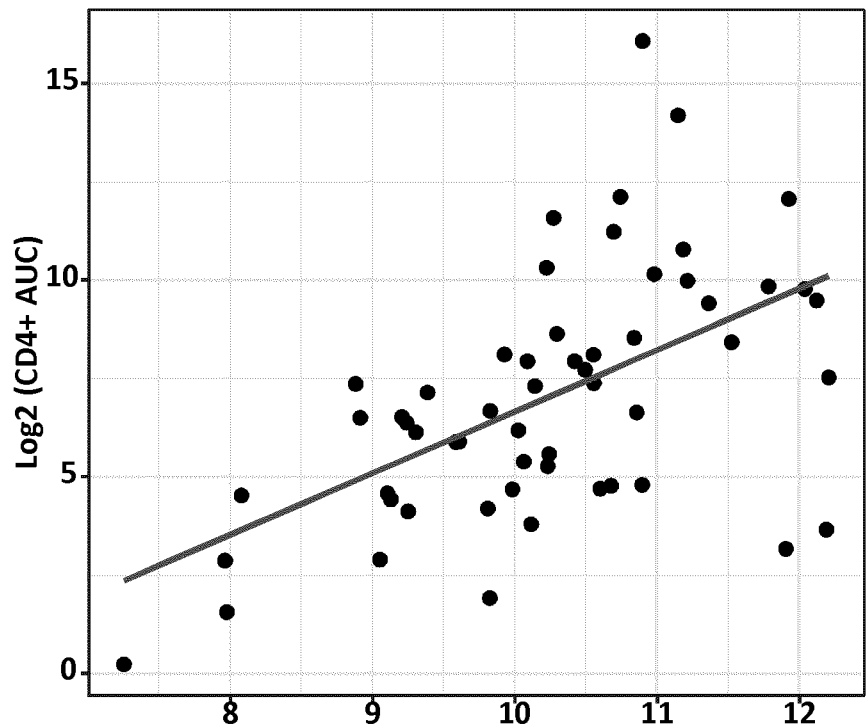


	значение P	Коэффициент
Спирмен	2.00E-03	0.42
Пирсон	7.00E-04	0.45

ФИГ.3В

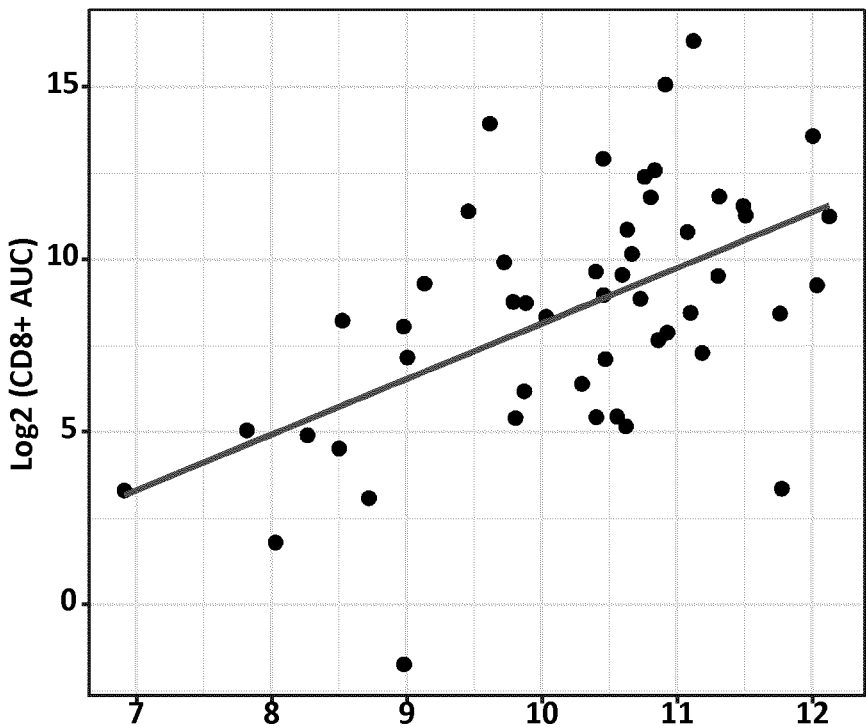


ФИГ.3С



Log₂ (введено CD4⁺CAR⁺CCR7⁺-клеток)

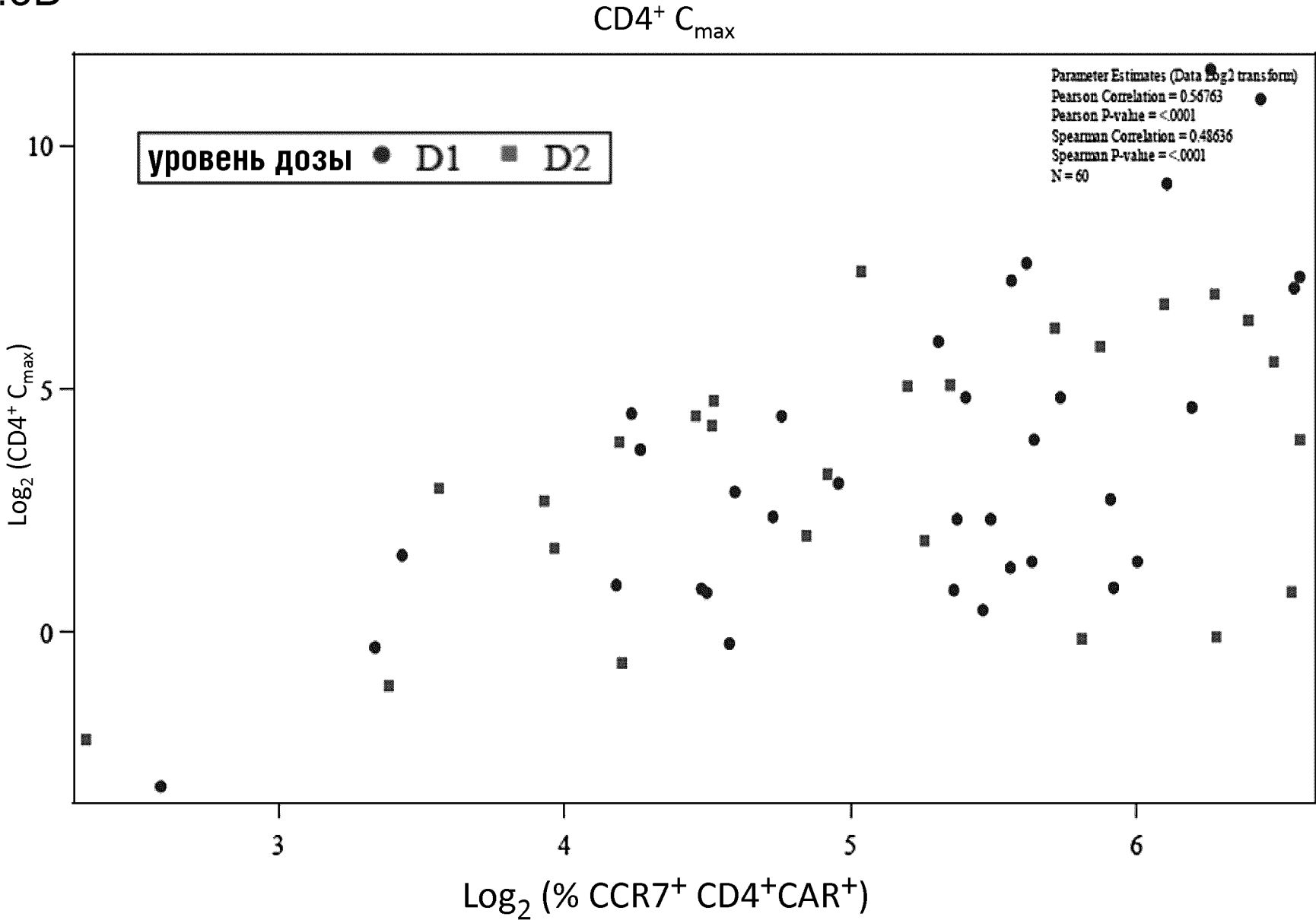
	значение Р	Коэффициент корреляции
Спирмен	<.001	0.583
Пирсон	<.001	0.555



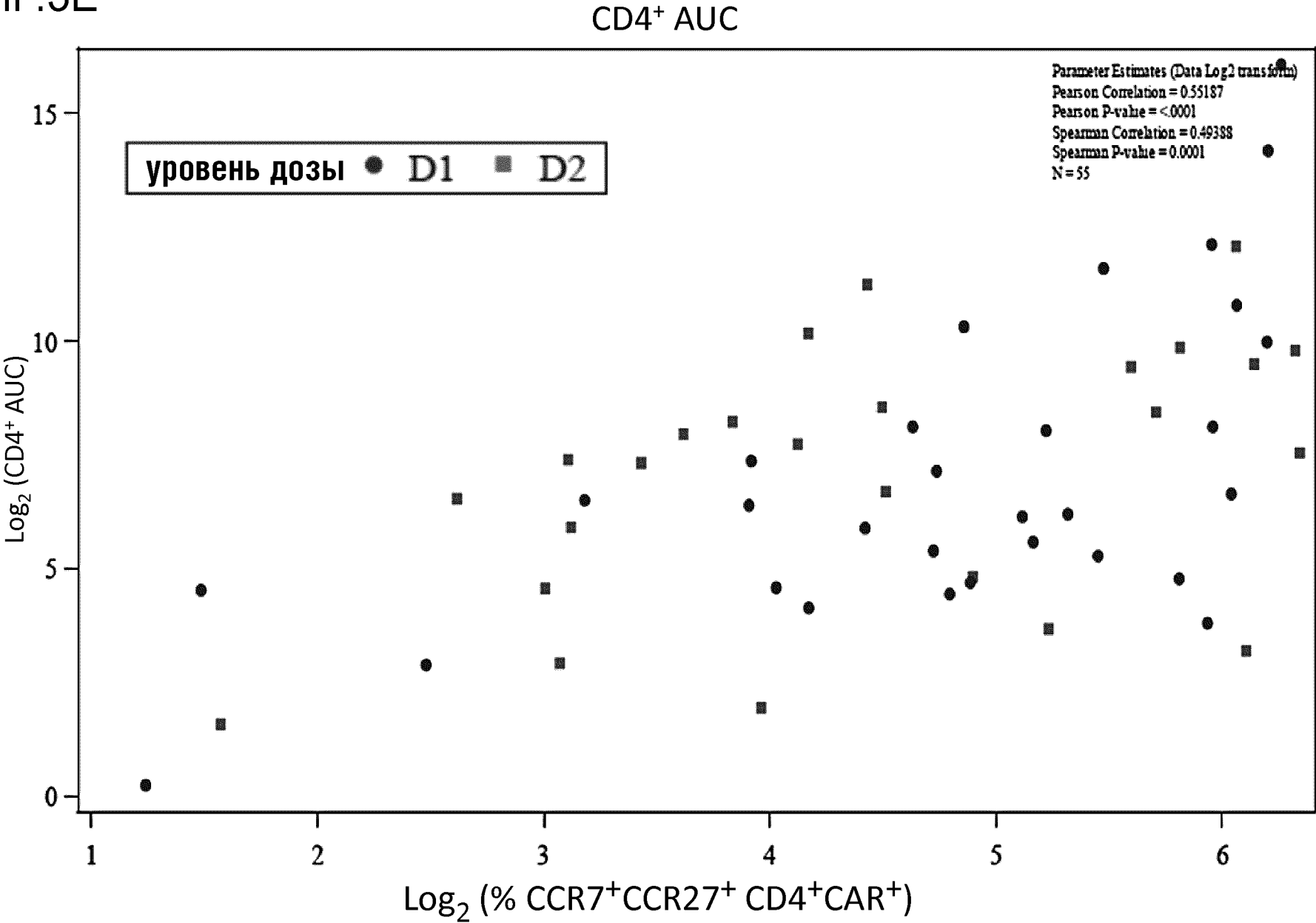
Log₂ (введено CD8⁺CAR⁺CCR7⁺-клеток)

	значение Р	Коэффициент корреляции
Спирмен	<.001	0.510
Пирсон	<.001	0.537

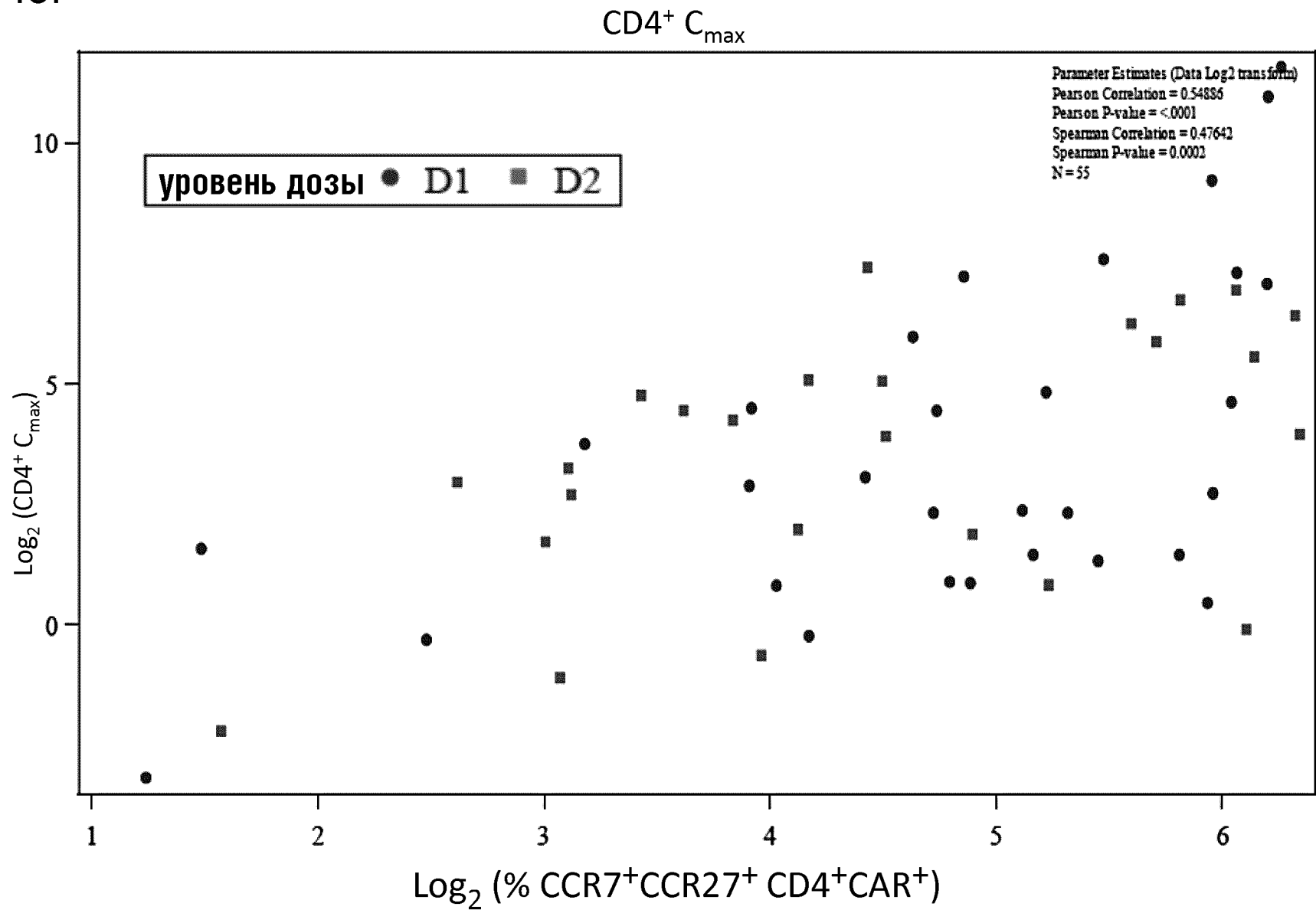
ФИГ.3D



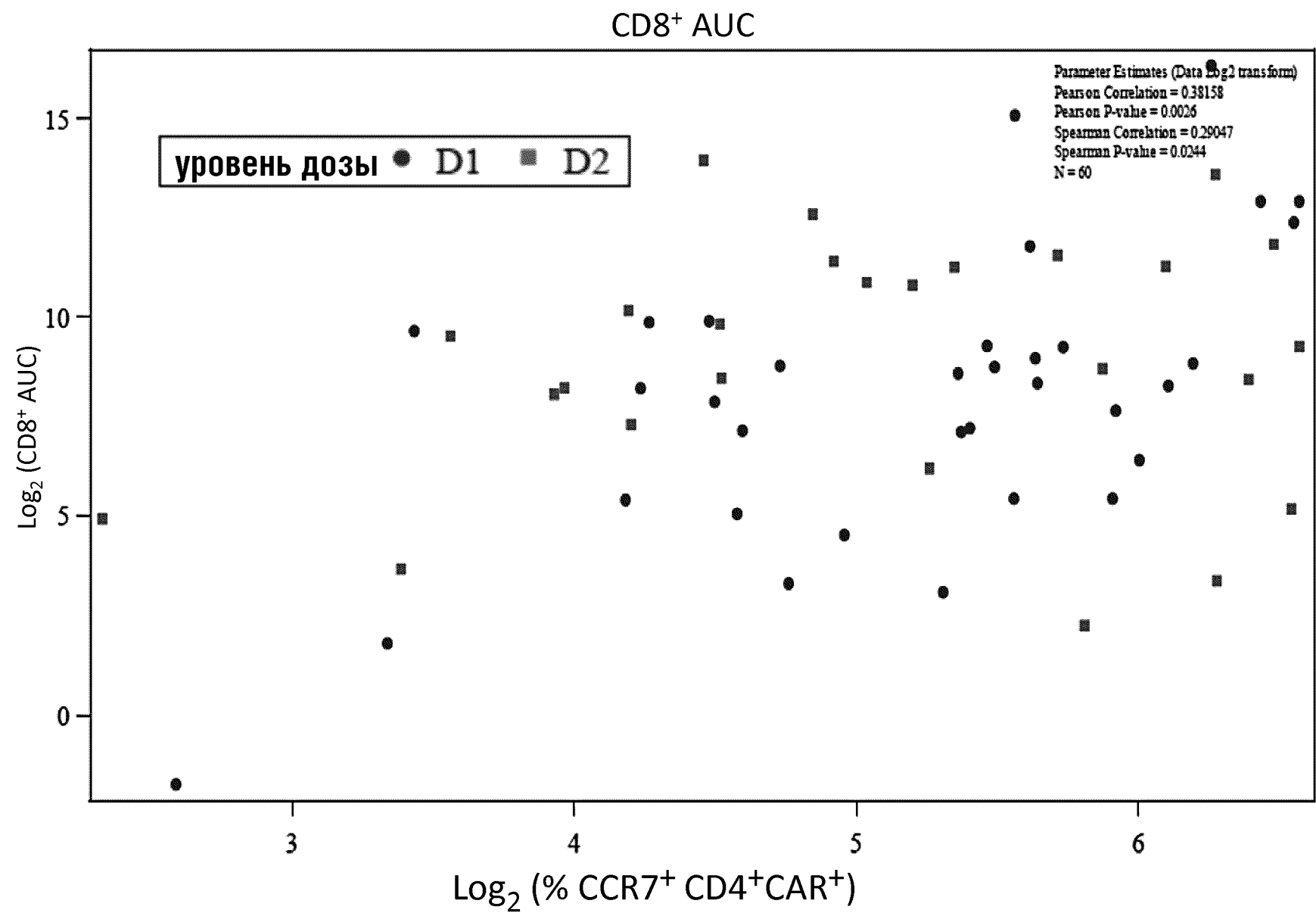
ФИГ.3Е



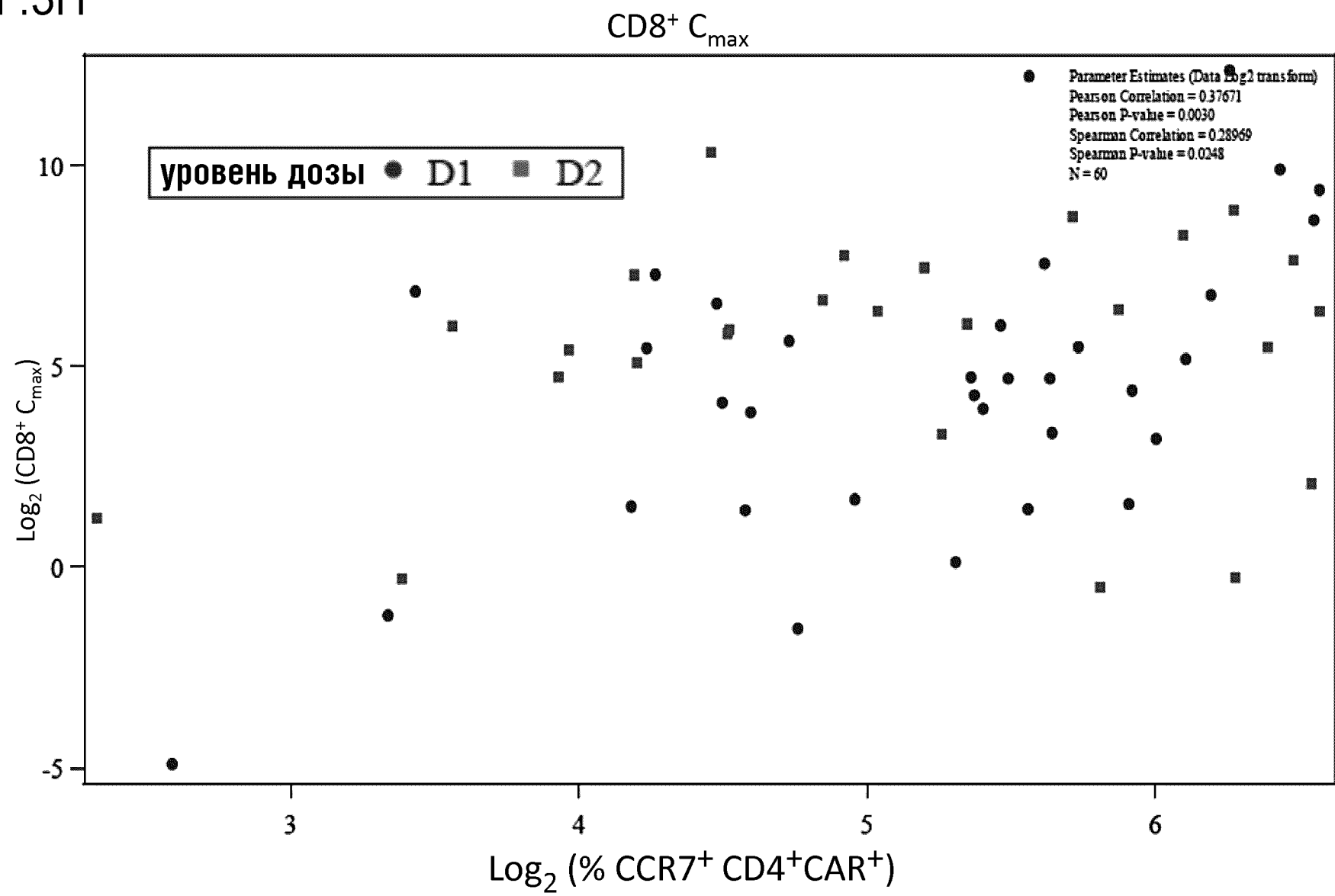
ФИГ.3F



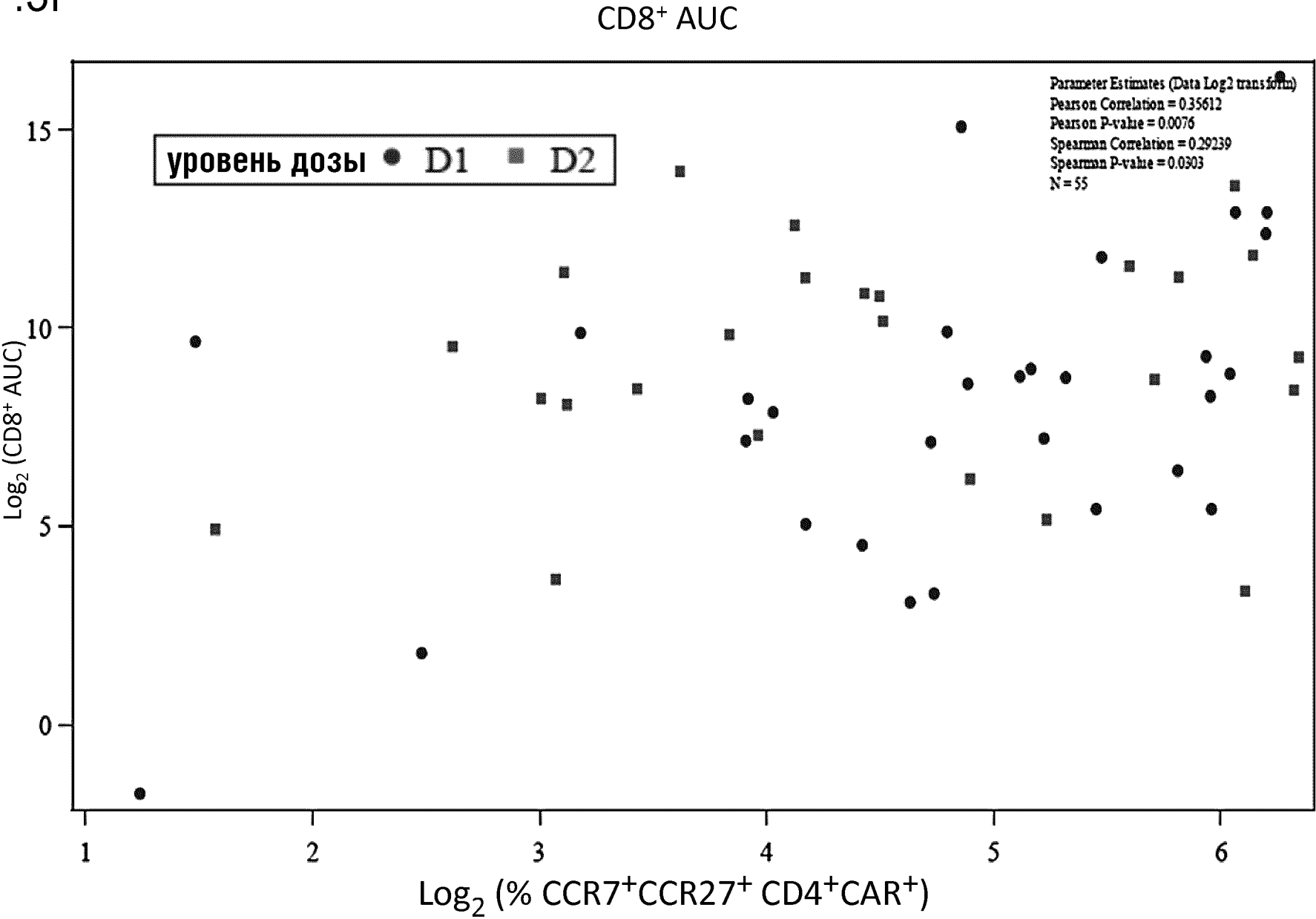
ФИГ.3G



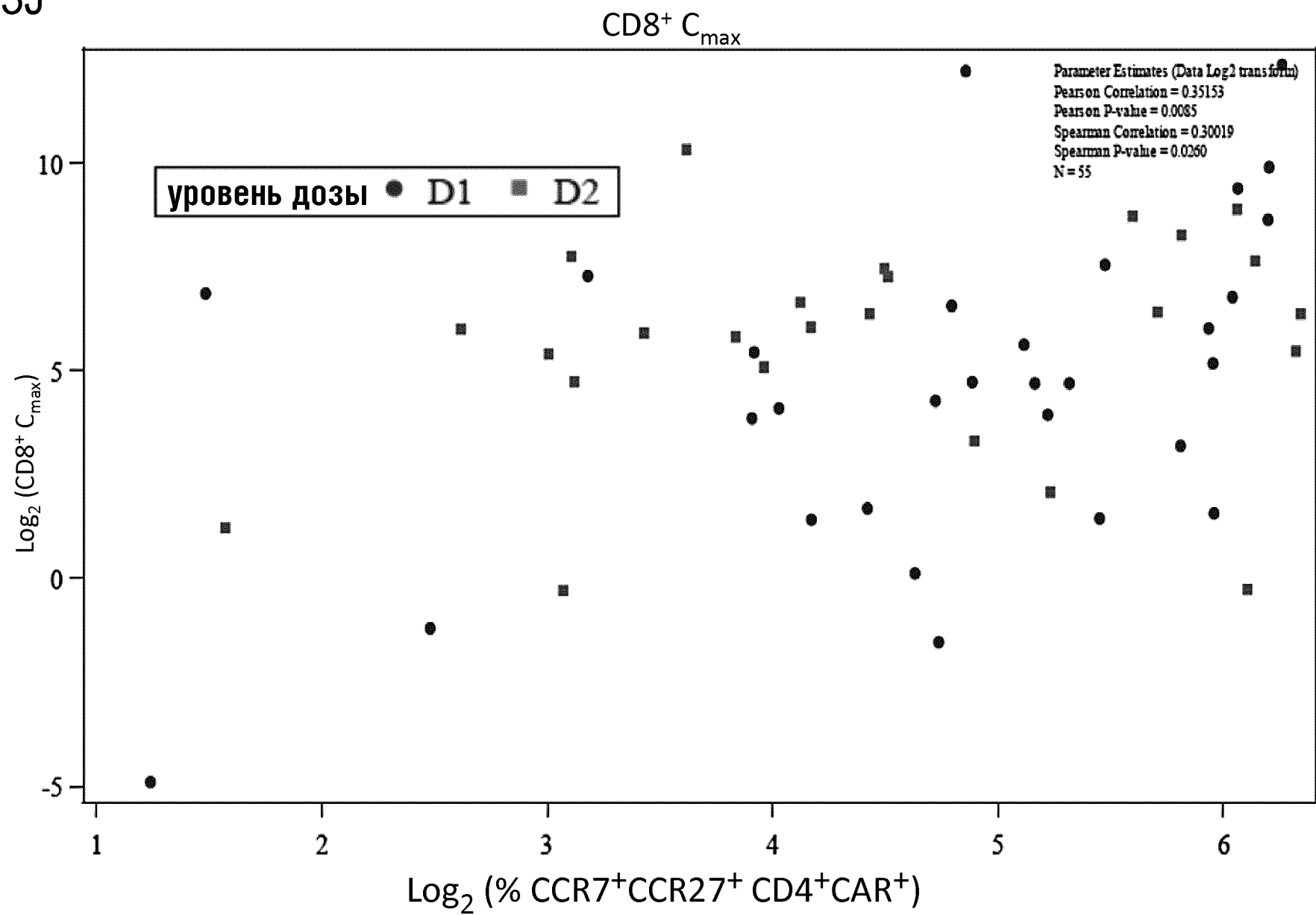
ФИГ.3Н



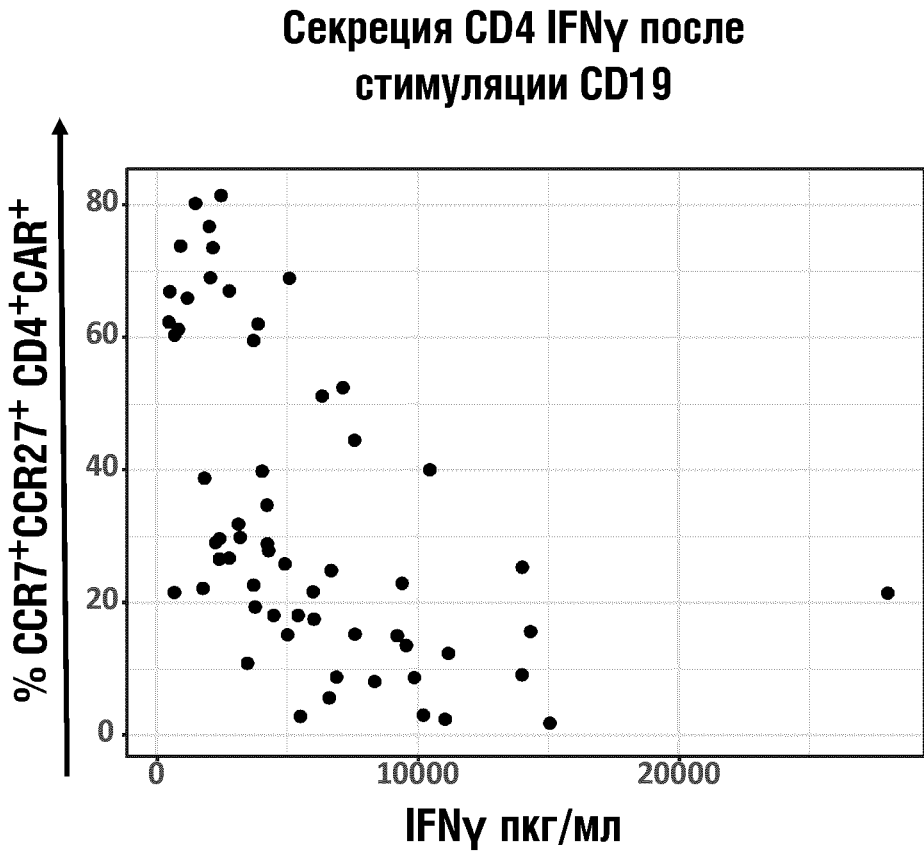
ФИГ.3I



ФИГ.3J

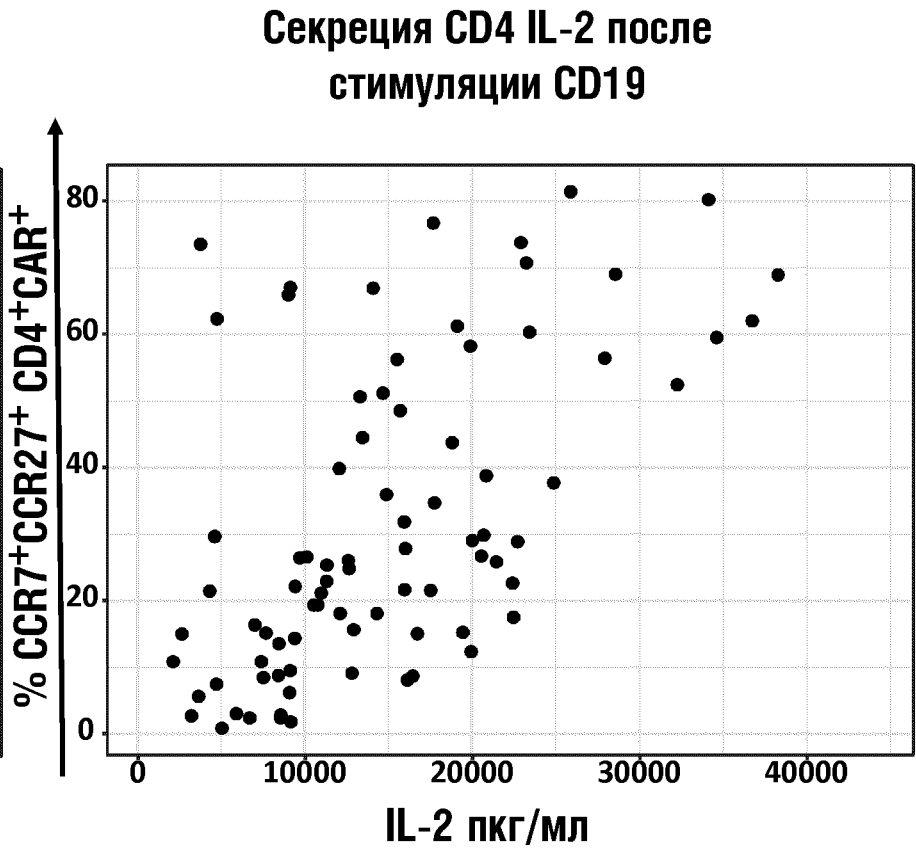


ФИГ.4А



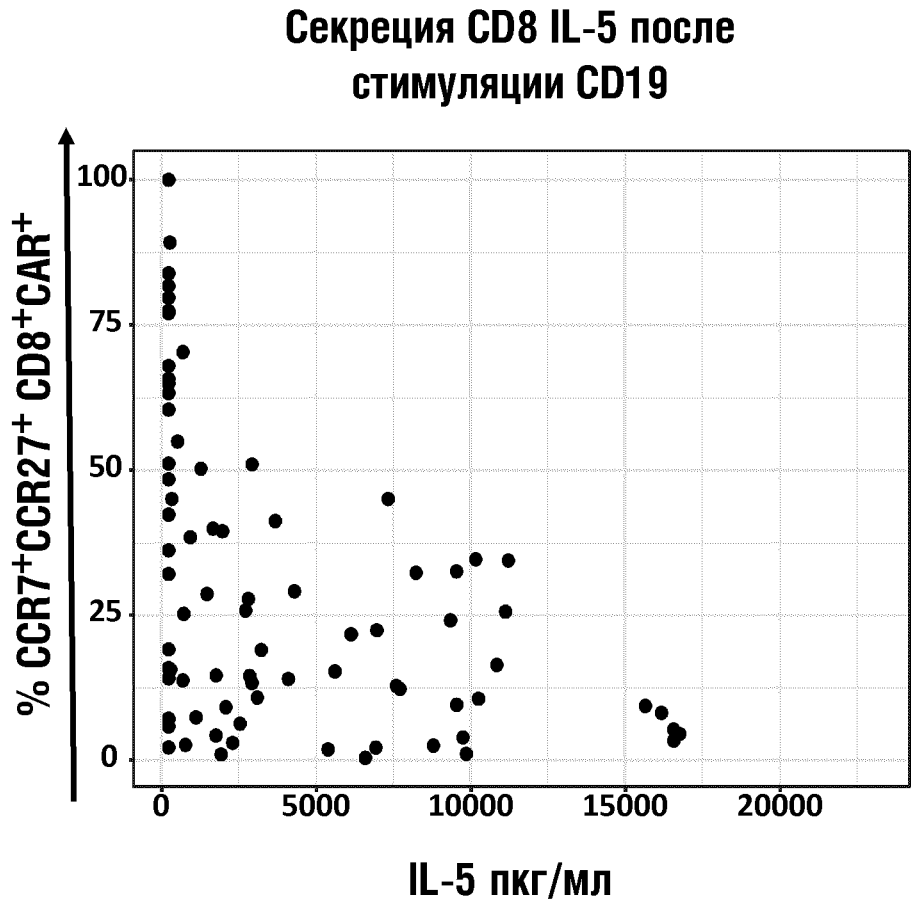
	значение Р	Коэффициент
Спирмен	8.81E-09	-0.67
Пирсон	2.55E-05	-0.51

ФИГ.4В



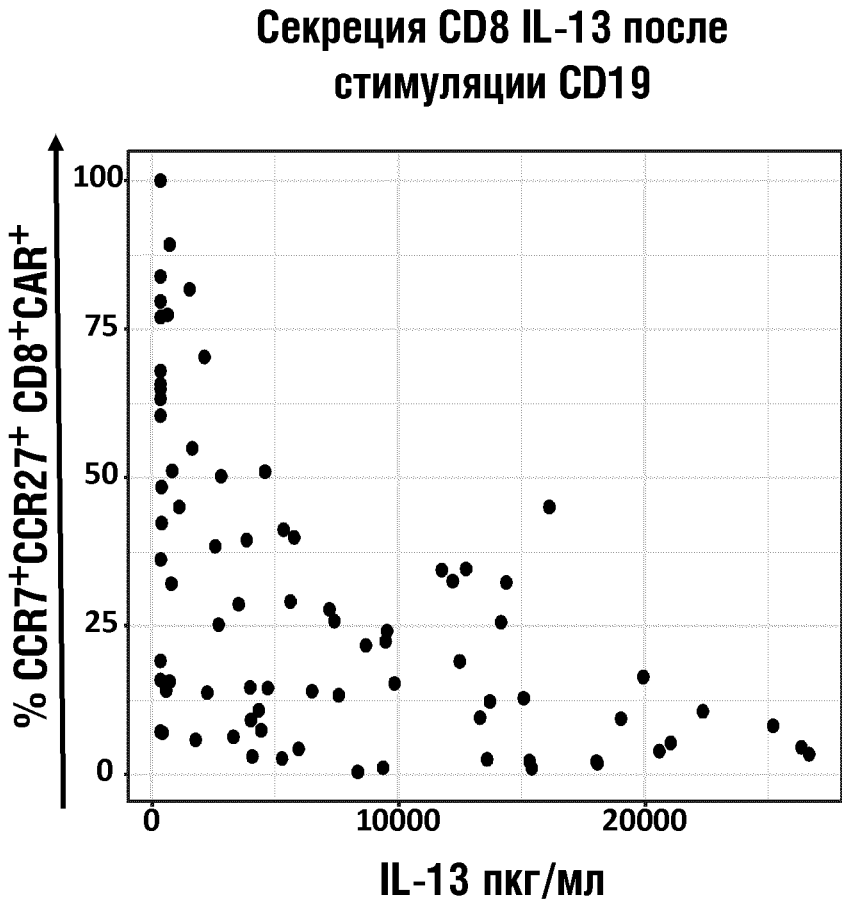
	значение Р	Коэффициент
Спирмен	2.25E-08	0.55
Пирсон	5.29E-08	0.54

ФИГ.5А



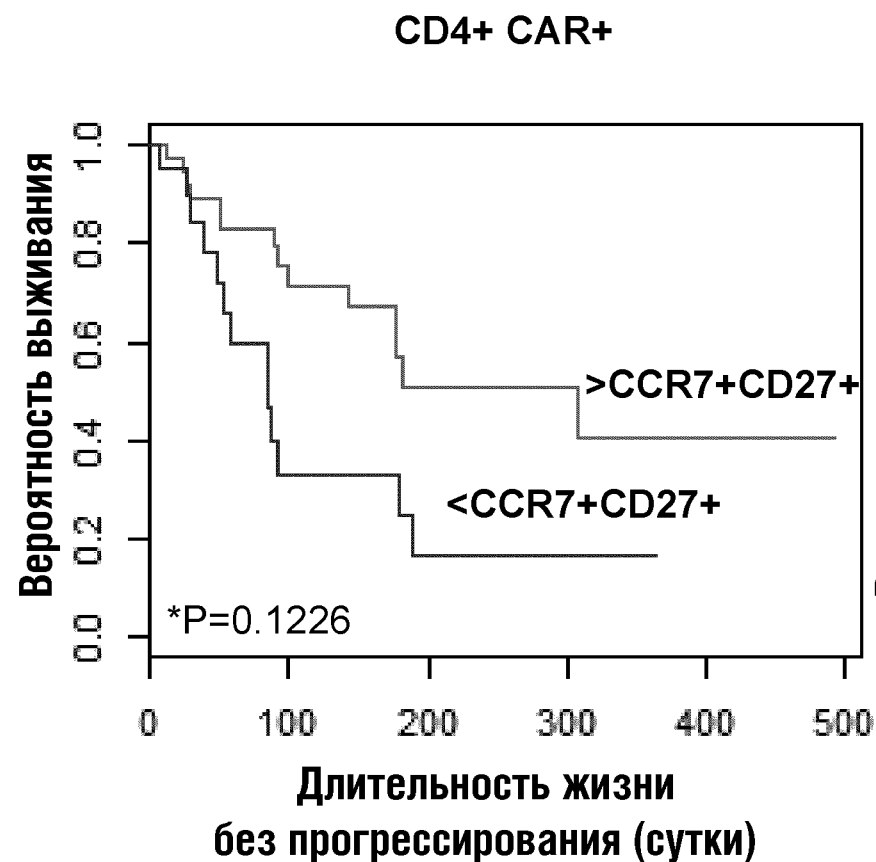
	значение P	Коэффициент
Спирмен	9.96E-06	-0.47
Пирсон	5.08E-05	-0.44

ФИГ.5В

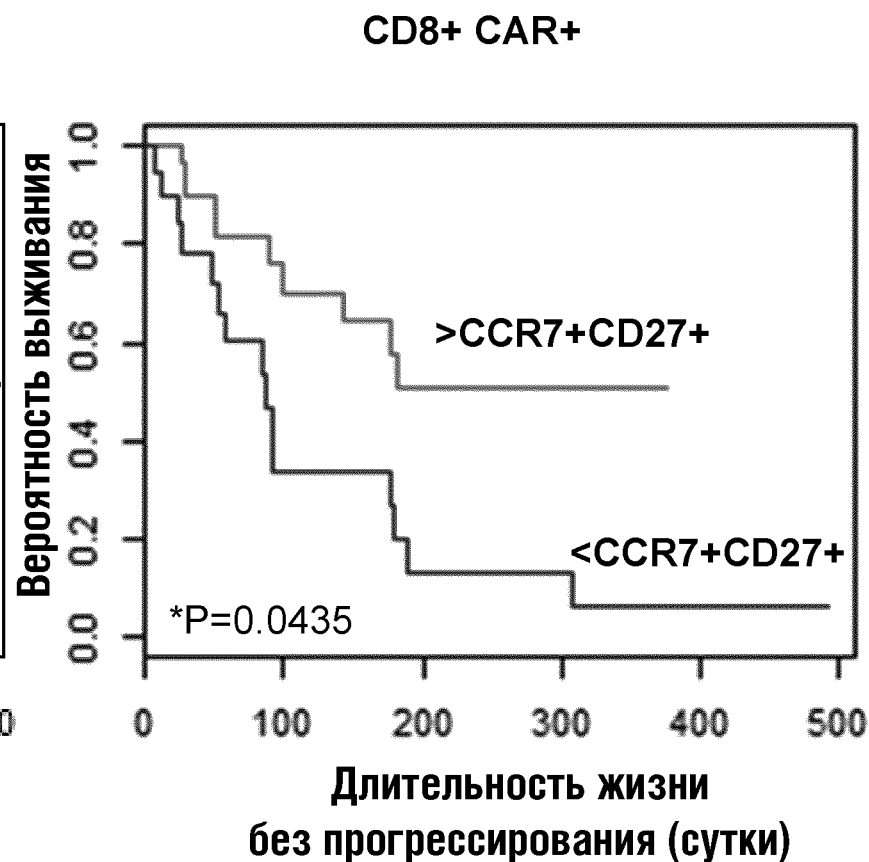


	значение P	Коэффициент
Спирмен	7.69E-09	-0.59
Пирсон	4.25E-07	-0.53

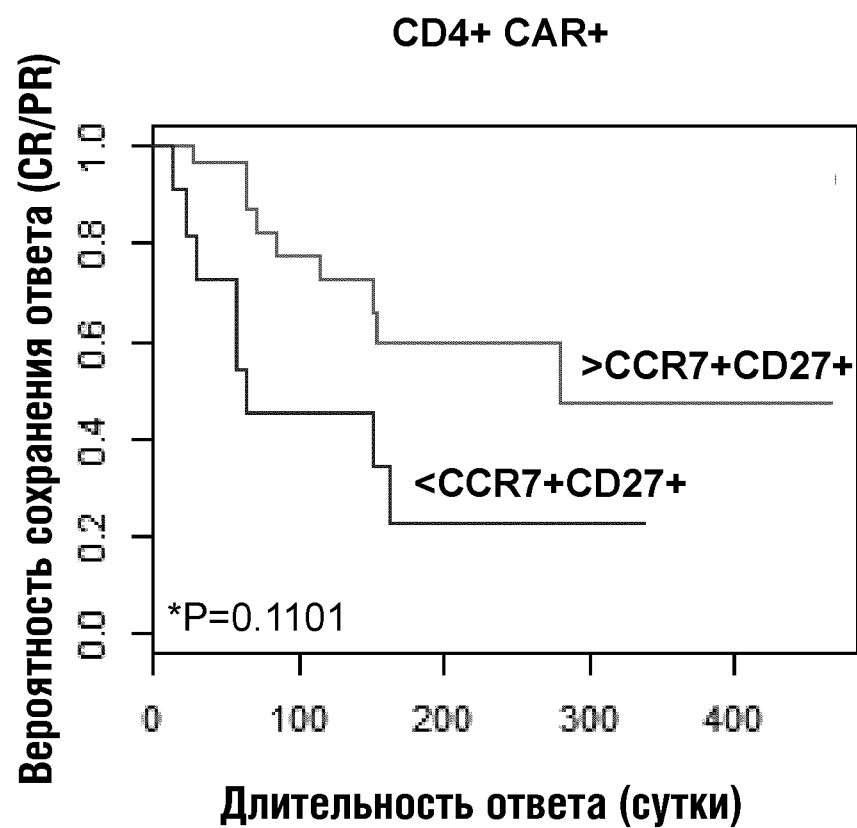
ФИГ.6А



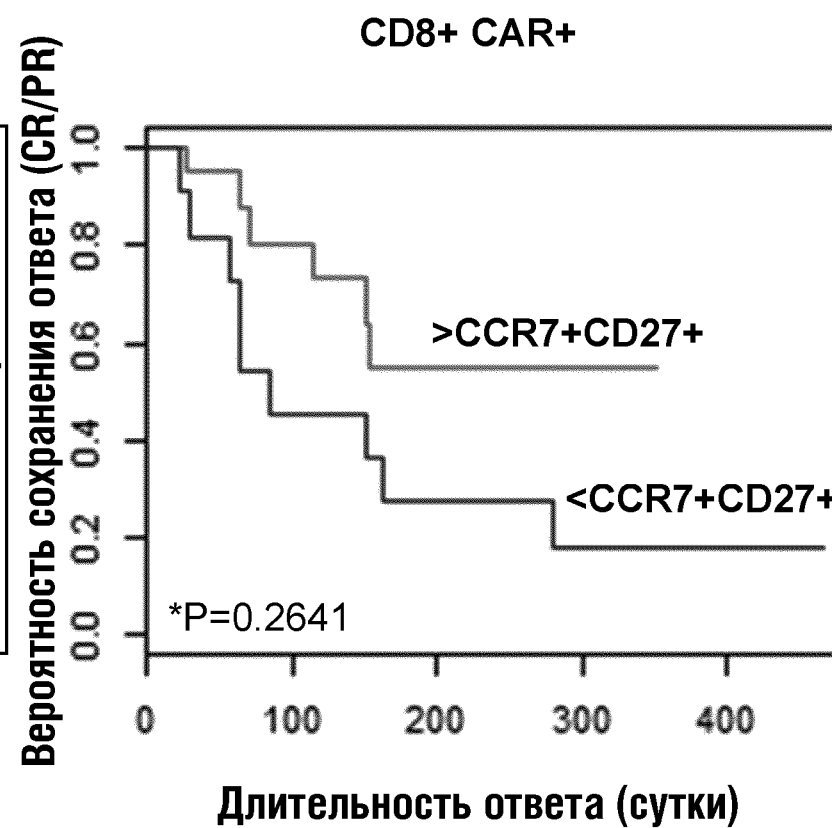
ФИГ.6В



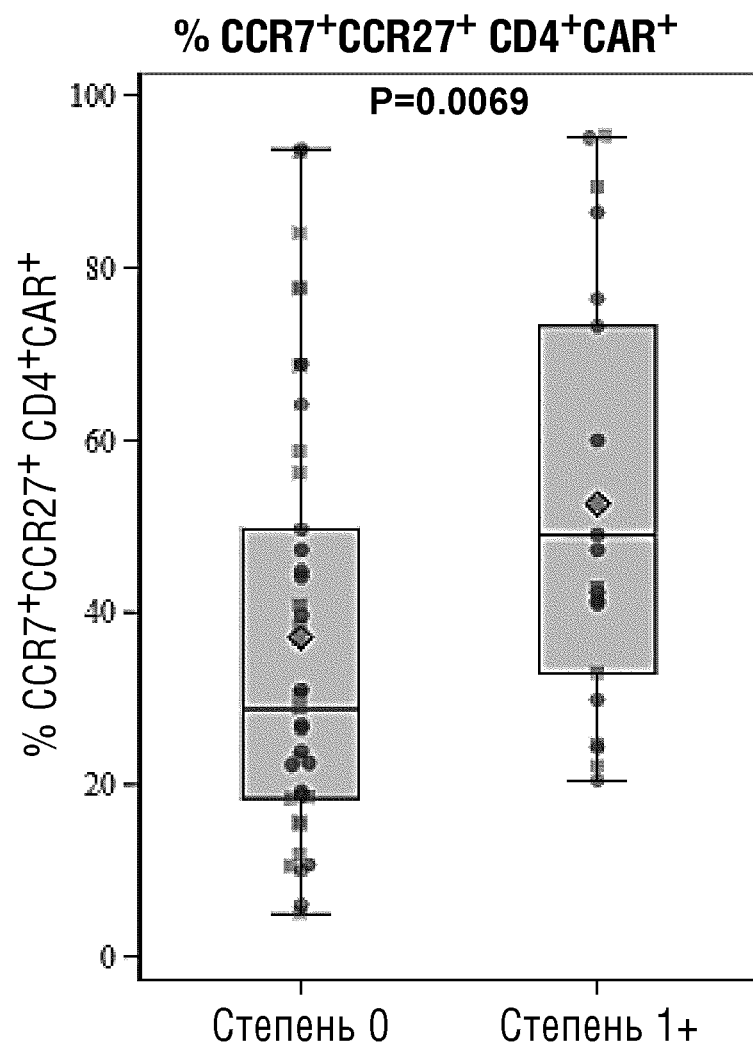
ФИГ.6С



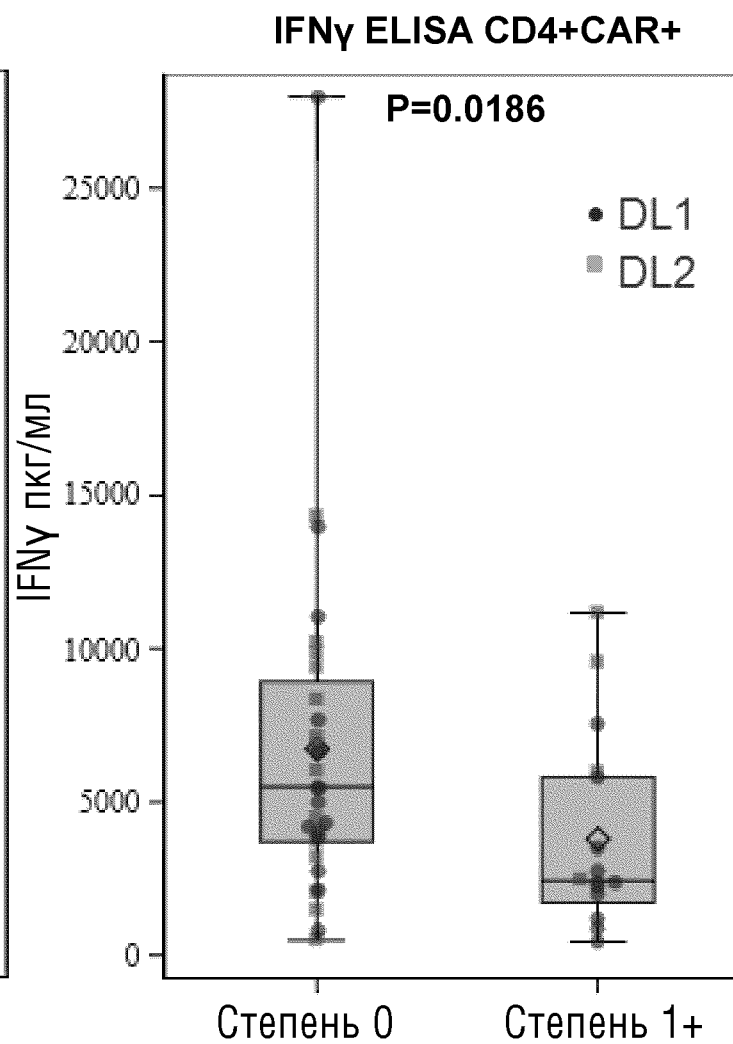
ФИГ.6D



ФИГ.7А

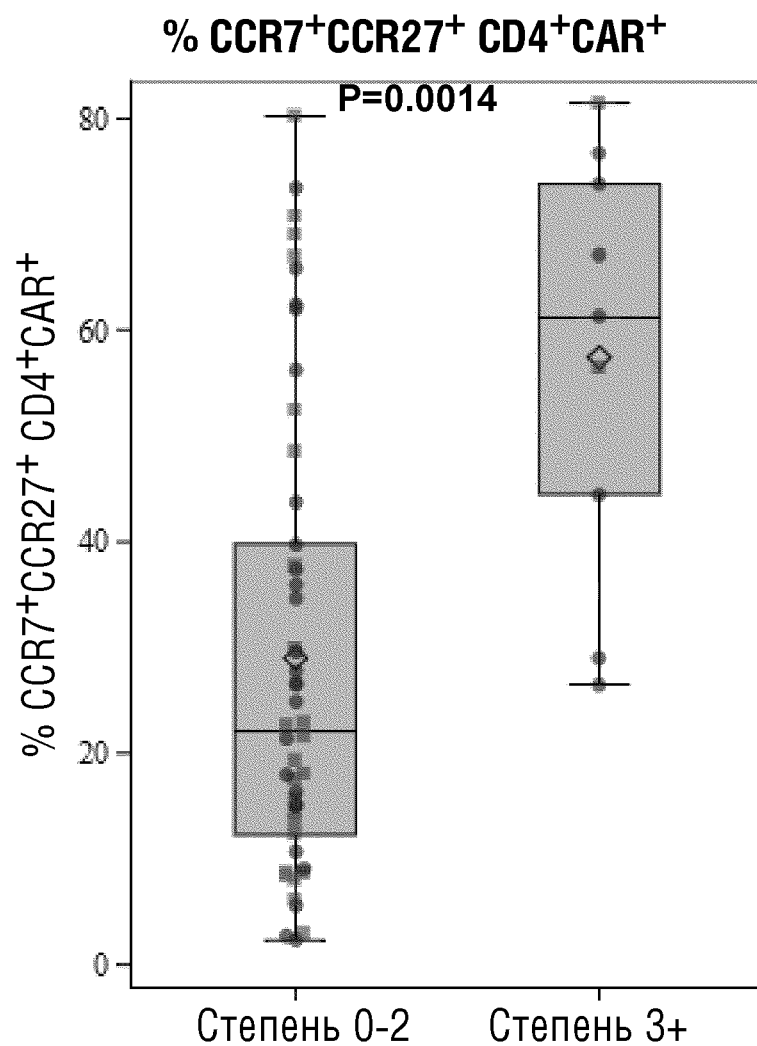


ФИГ.7В

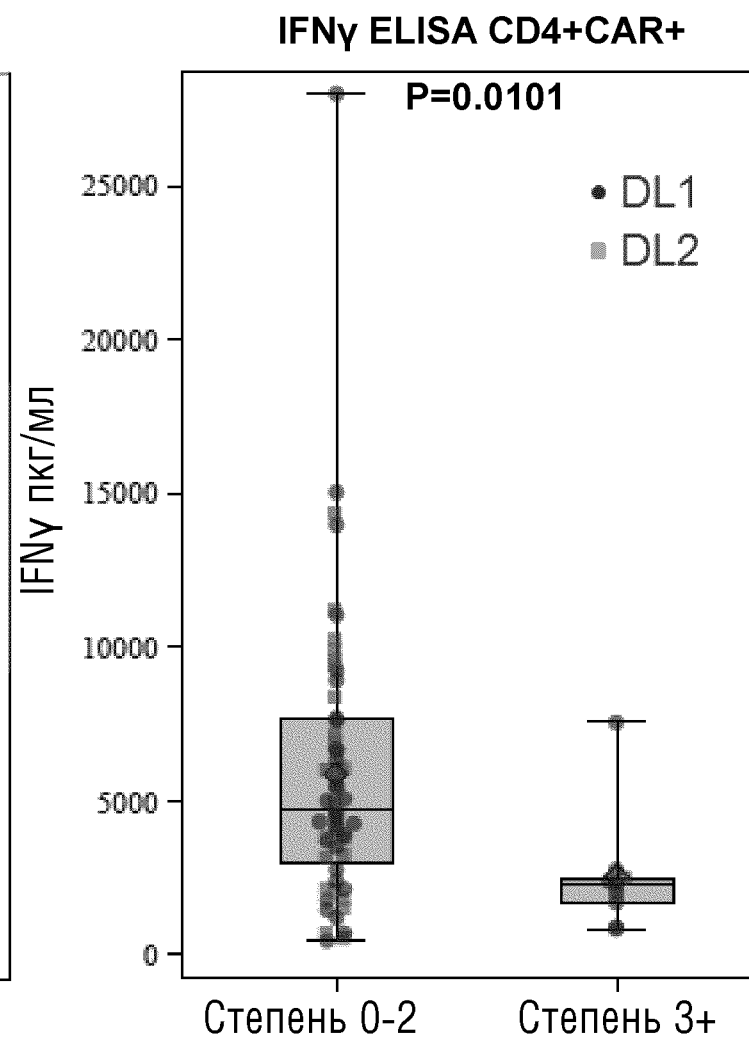


Синдром высвобождения цитокинов Степень 0 по сравнению со Степенью 1+

ФИГ.7С

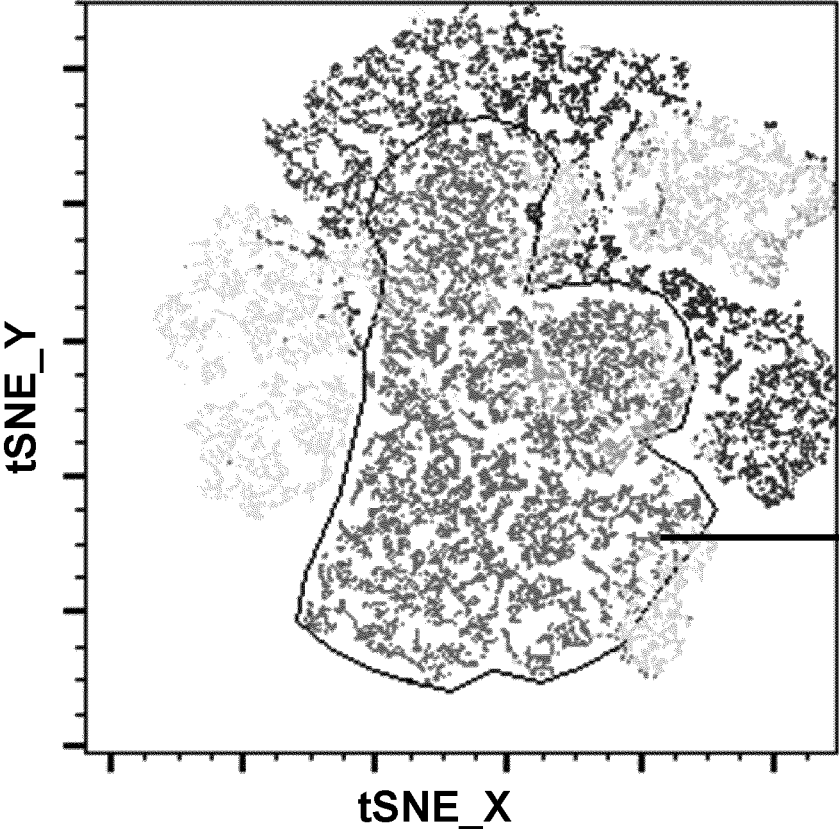


ФИГ.7D

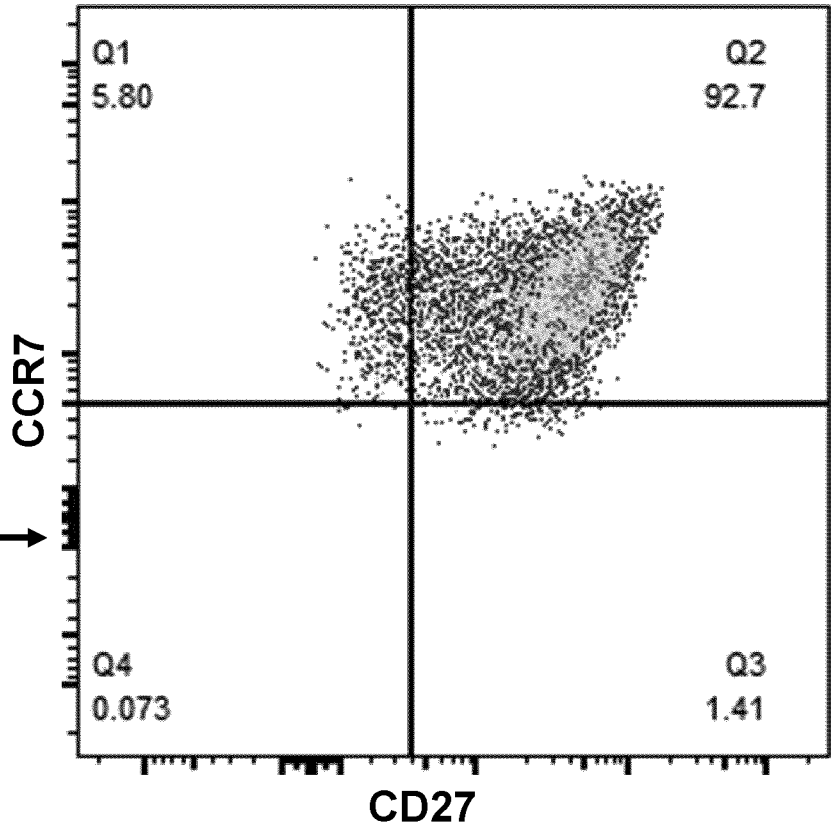


Нейротоксичность степени 0-2 по сравнению со степенью 3+

ФИГ.8А



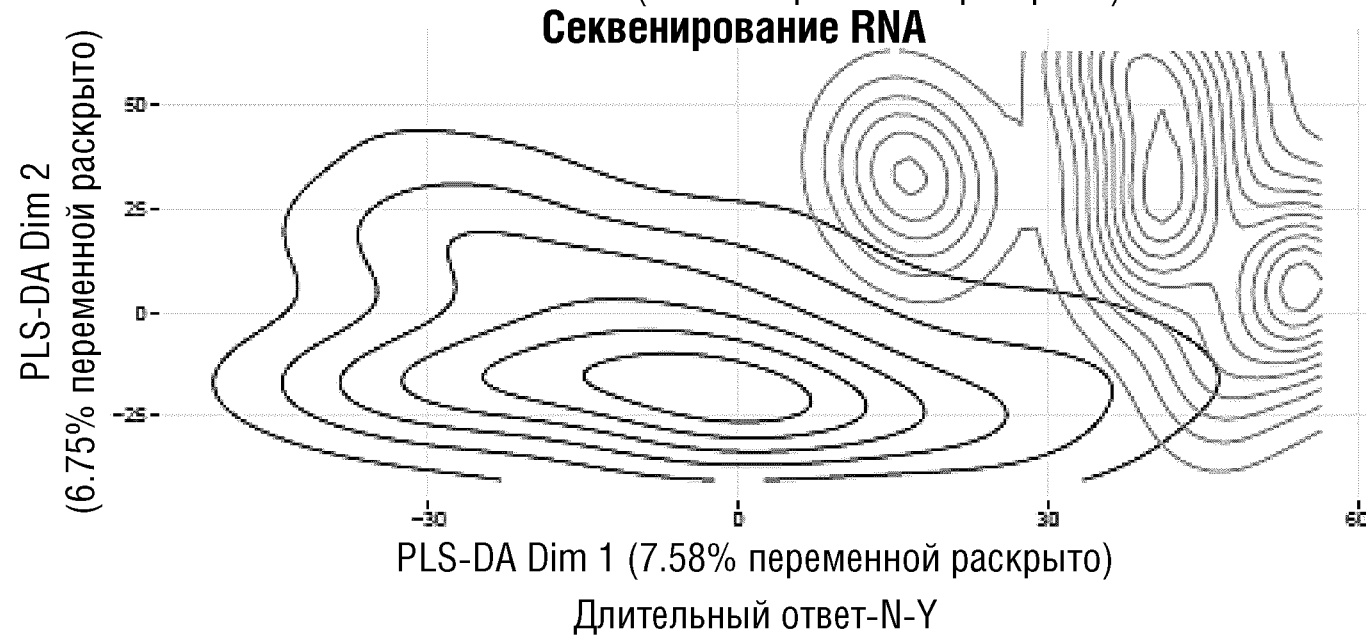
ФИГ.8В



ФИГ.9А



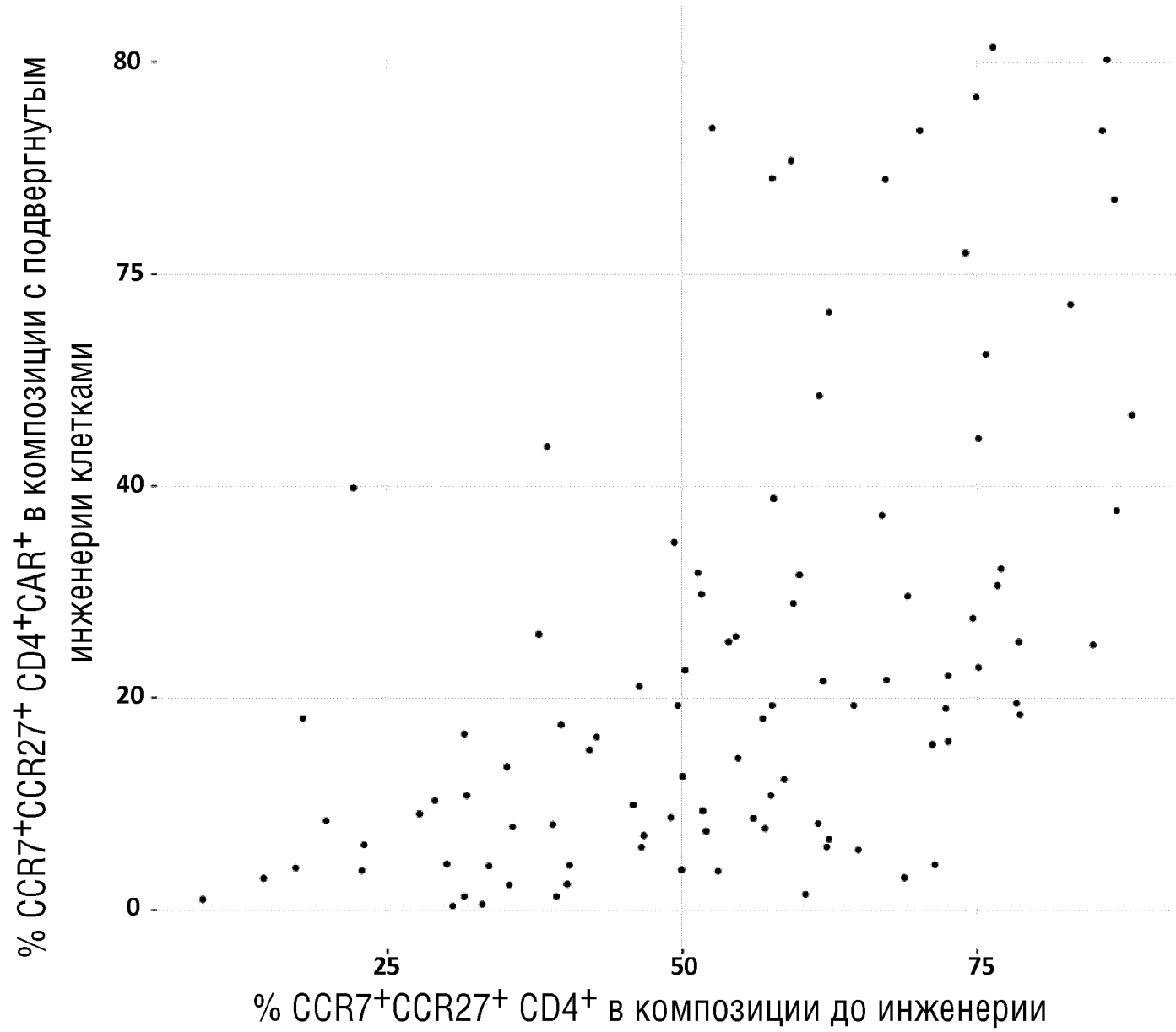
ФИГ.9В



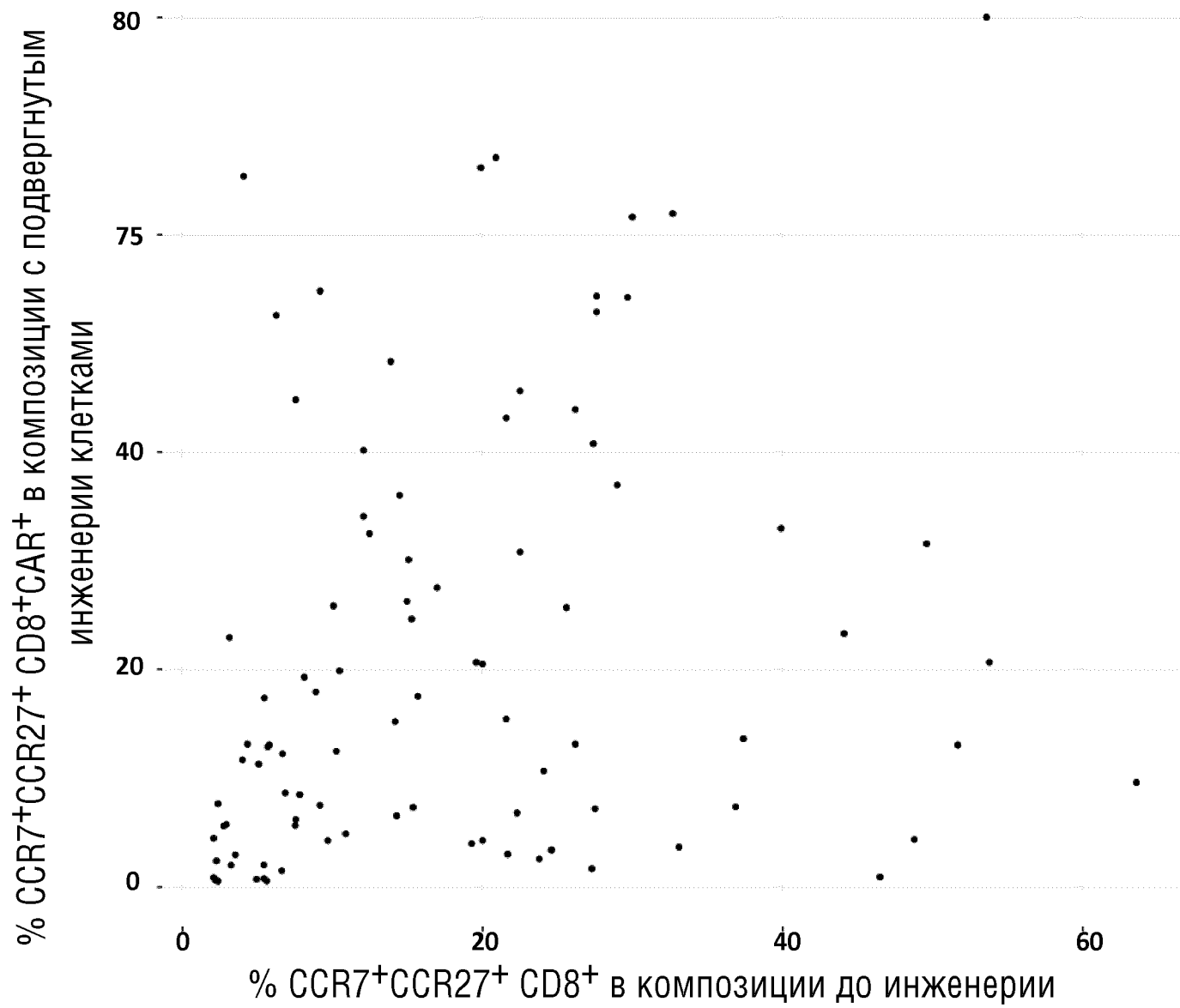
ФИГ.9С



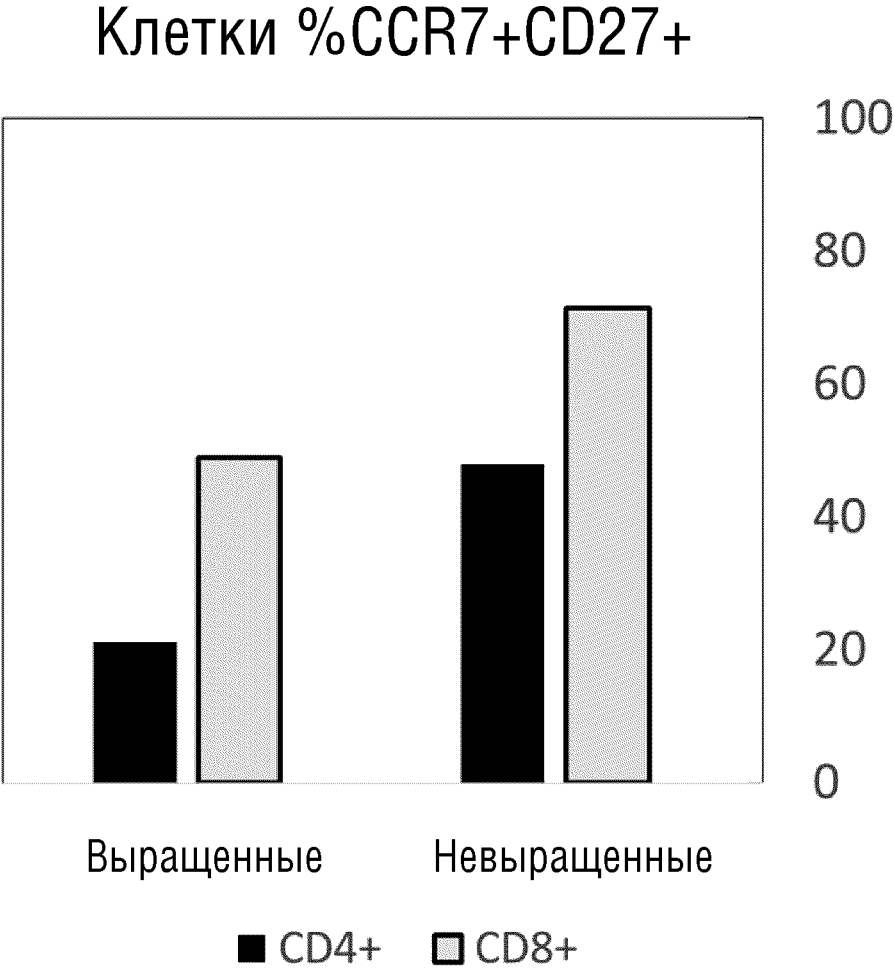
ФИГ.10А



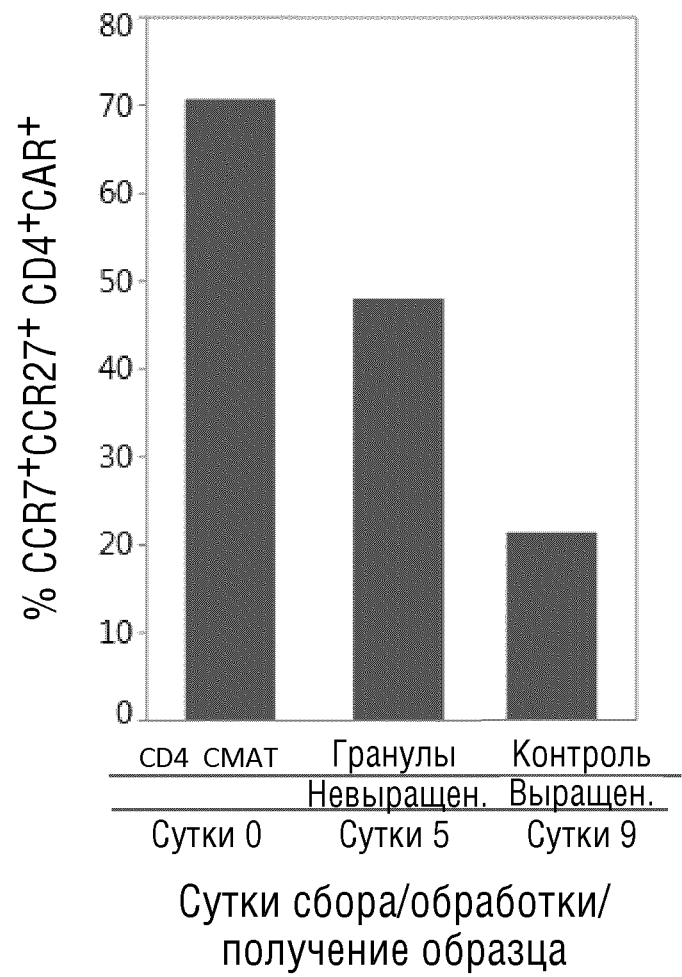
ФИГ.10В



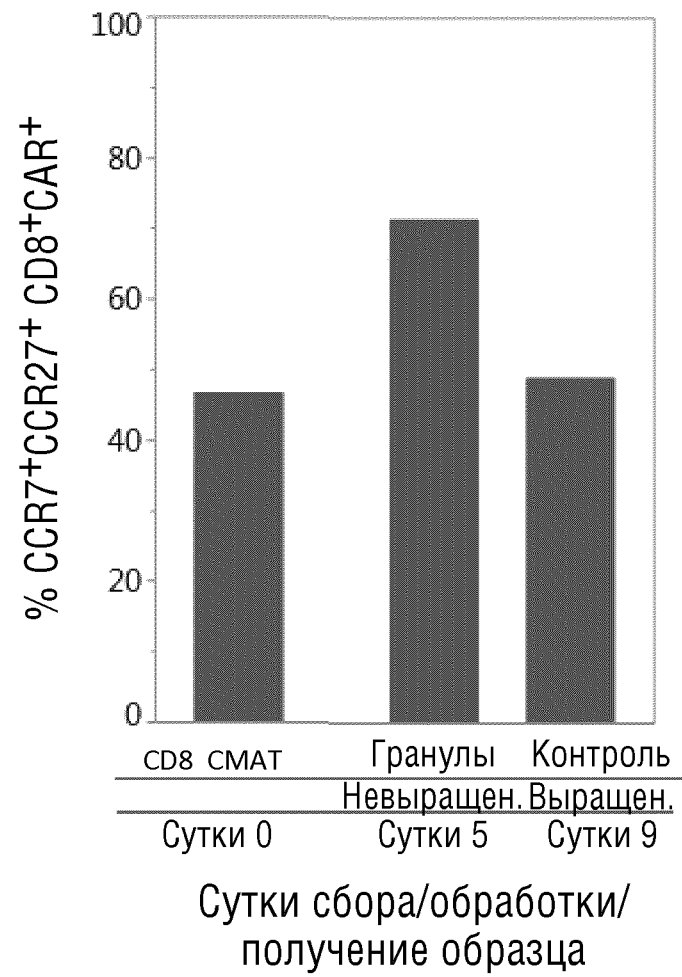
ФИГ.11А



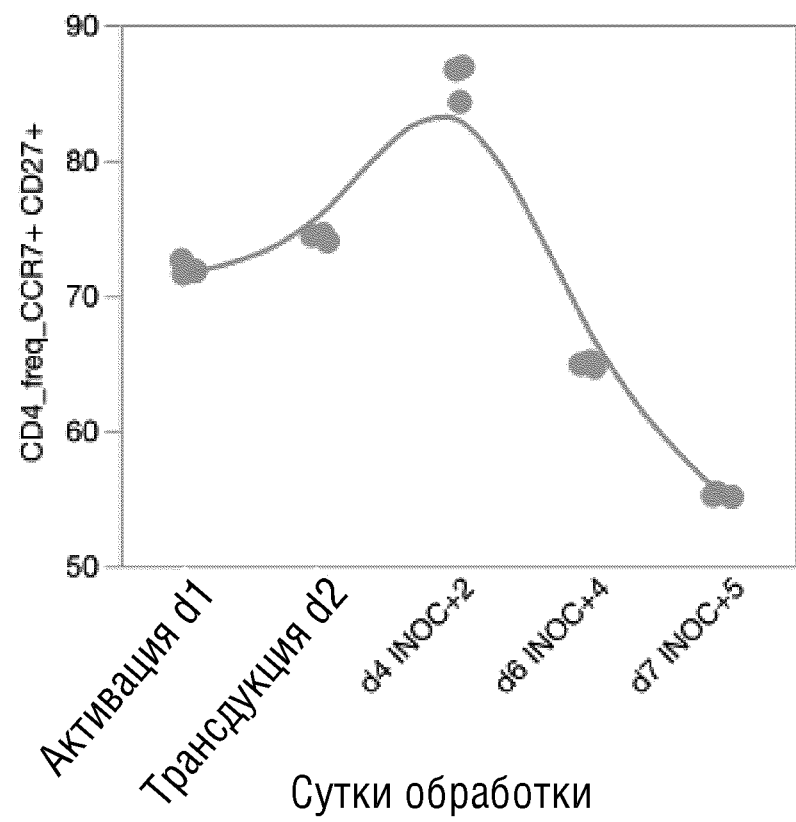
ФИГ.11В



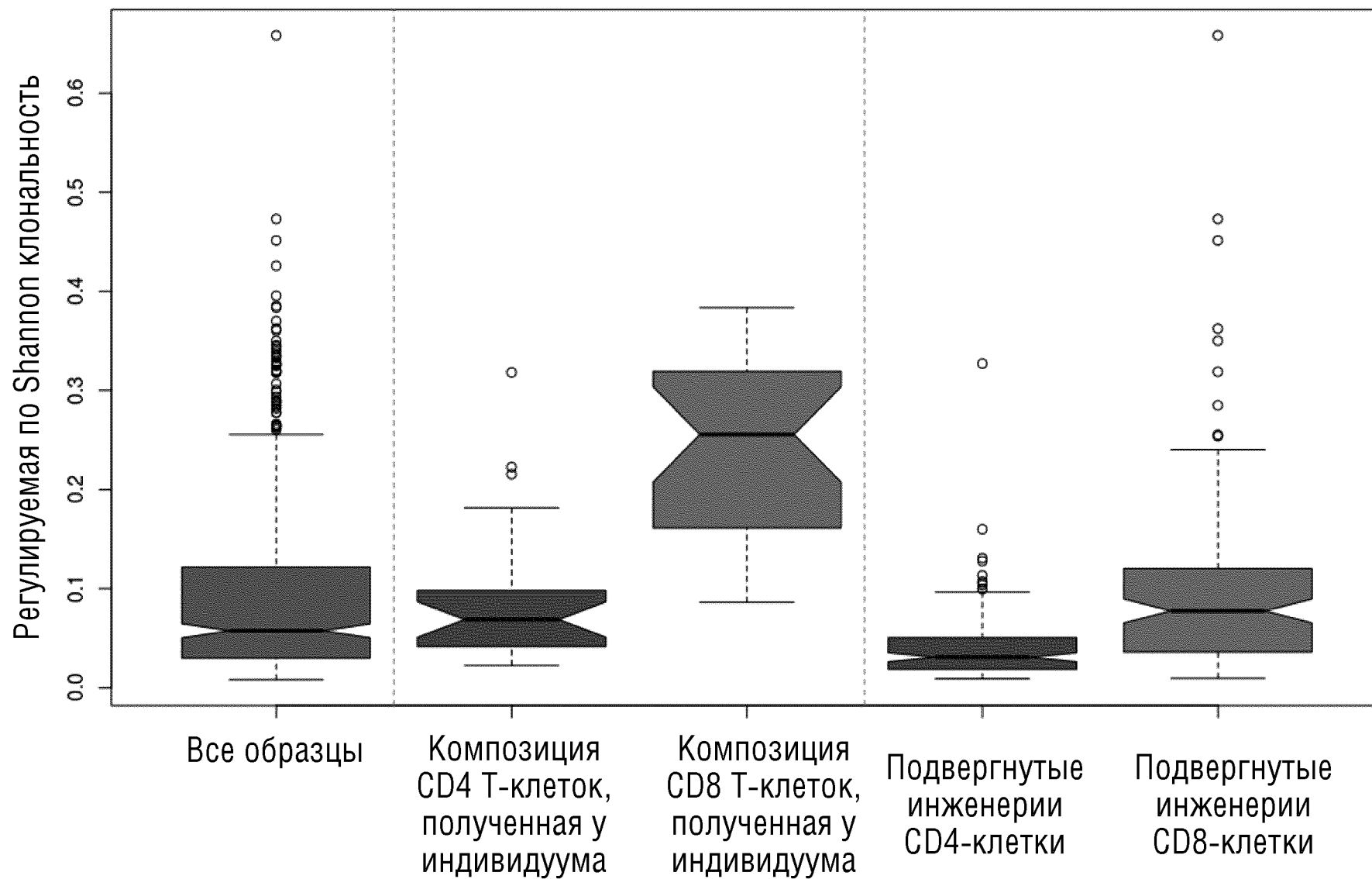
ФИГ.11С



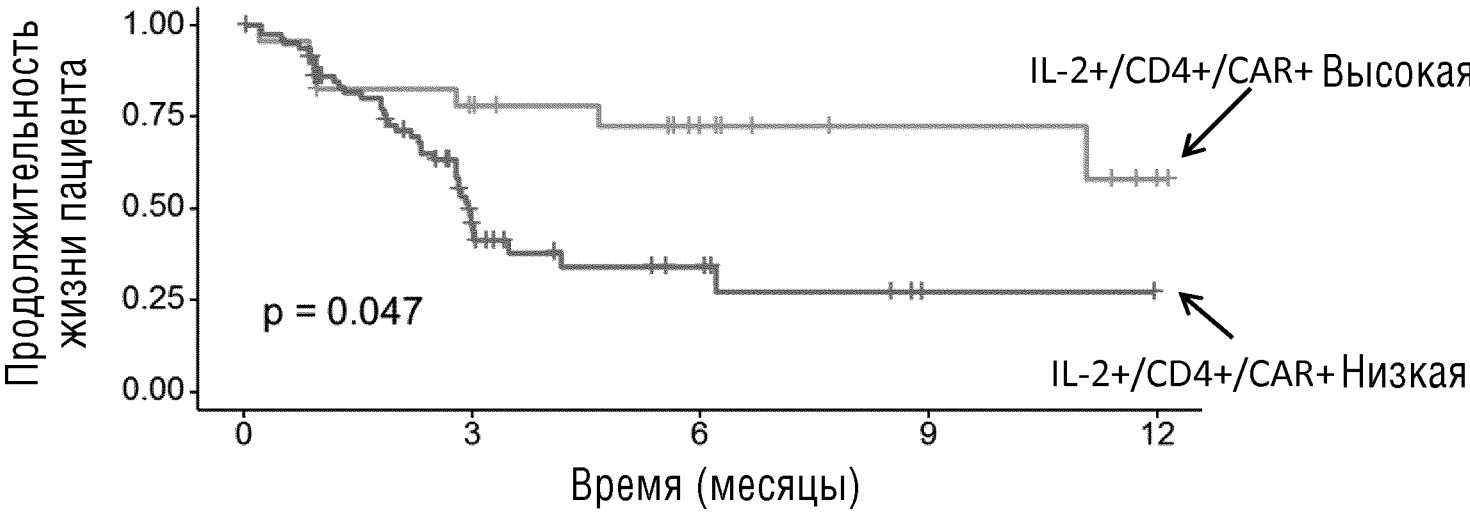
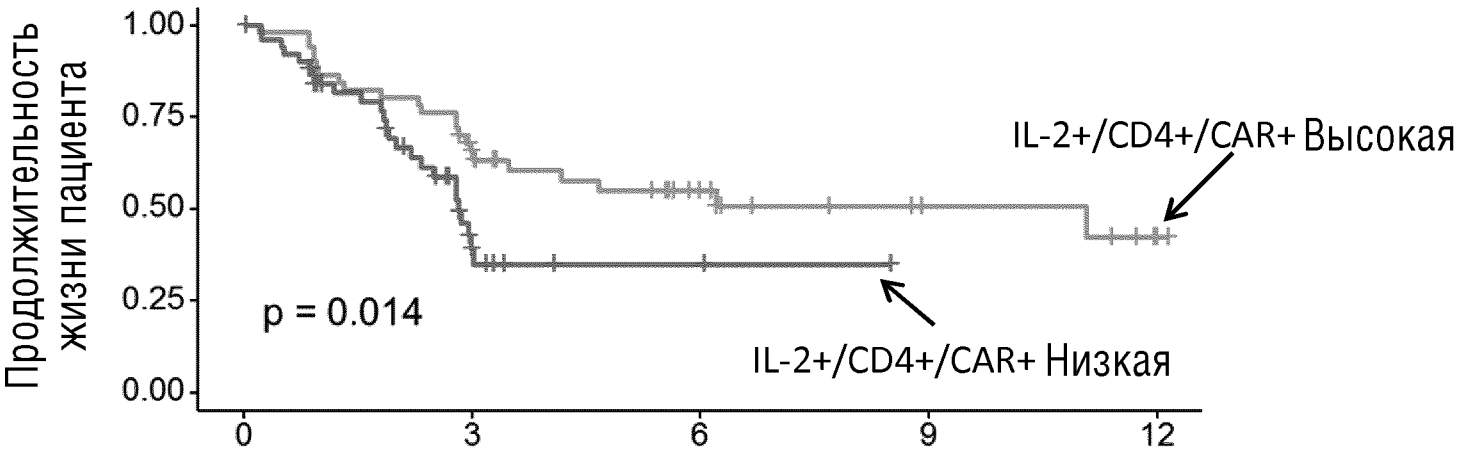
ФИГ.11D



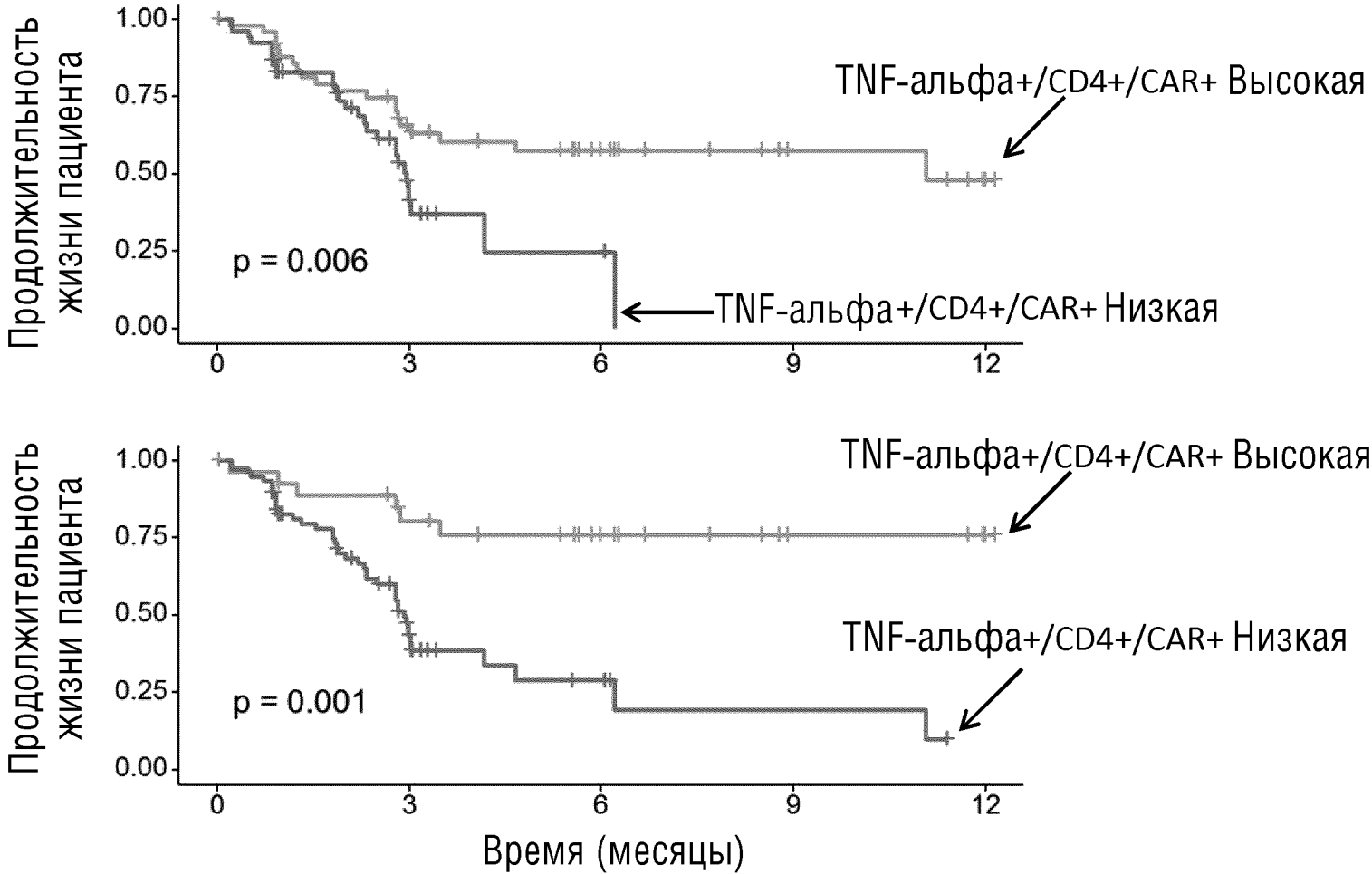
ФИГ.12



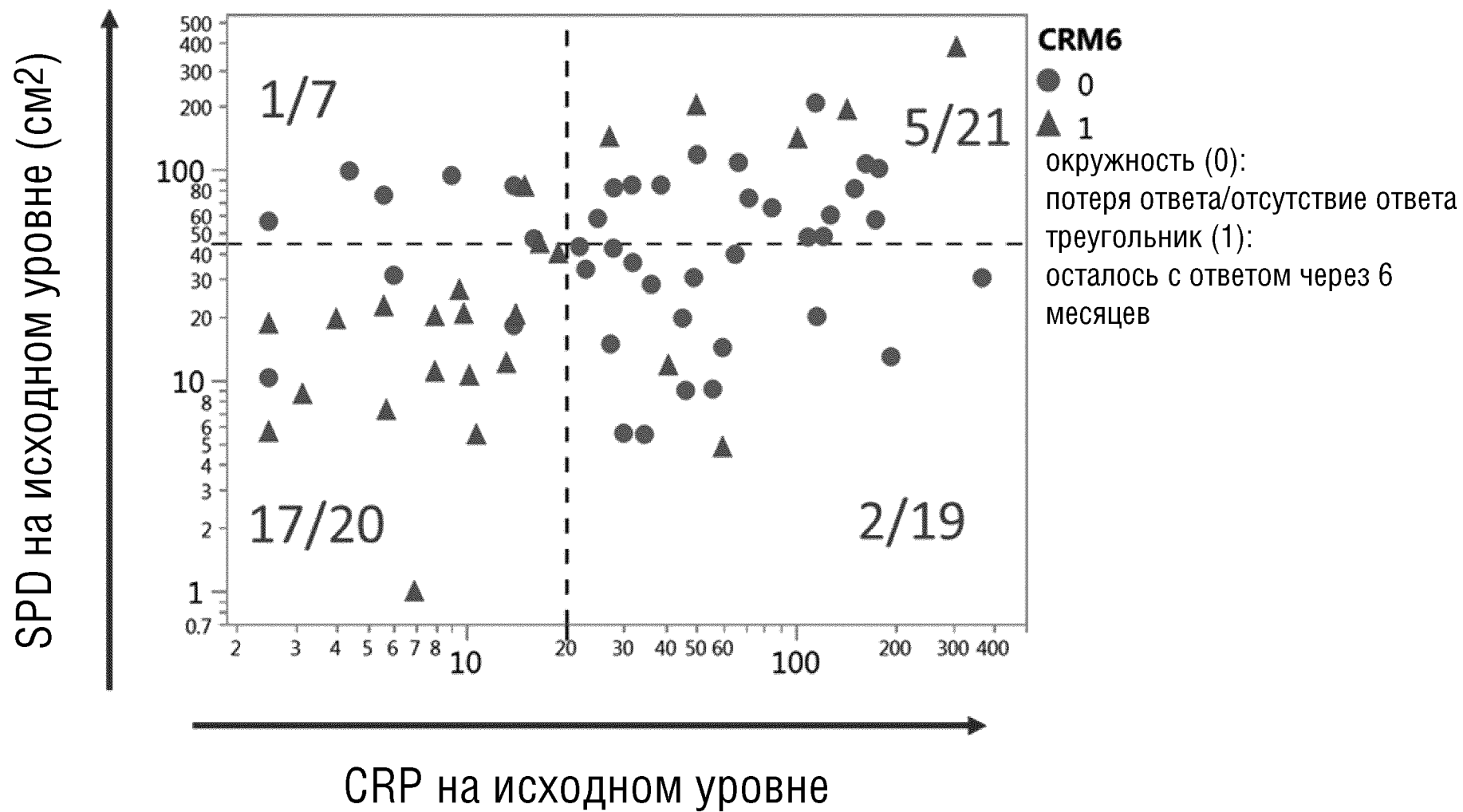
ФИГ.13А



ФИГ.13В

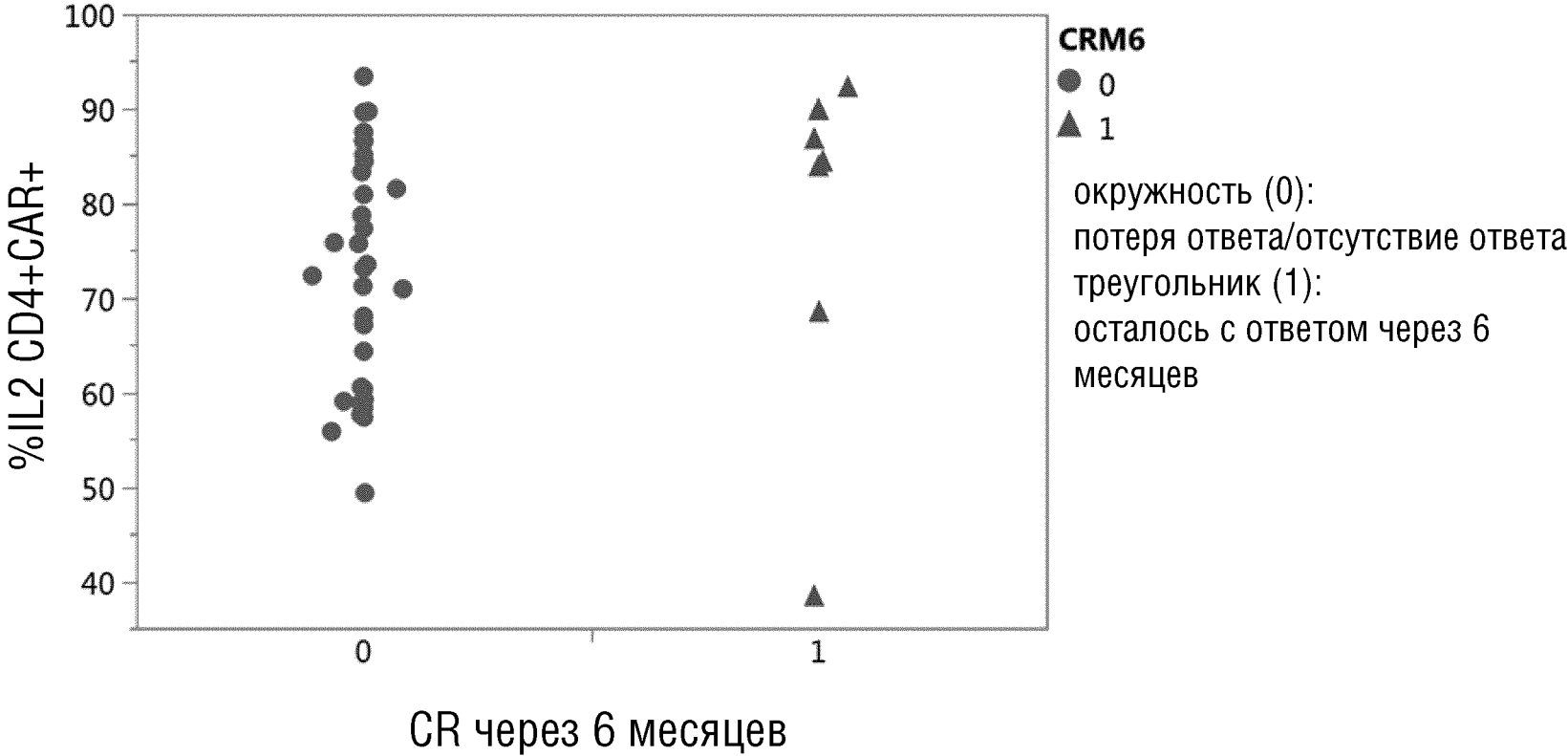


ФИГ.14



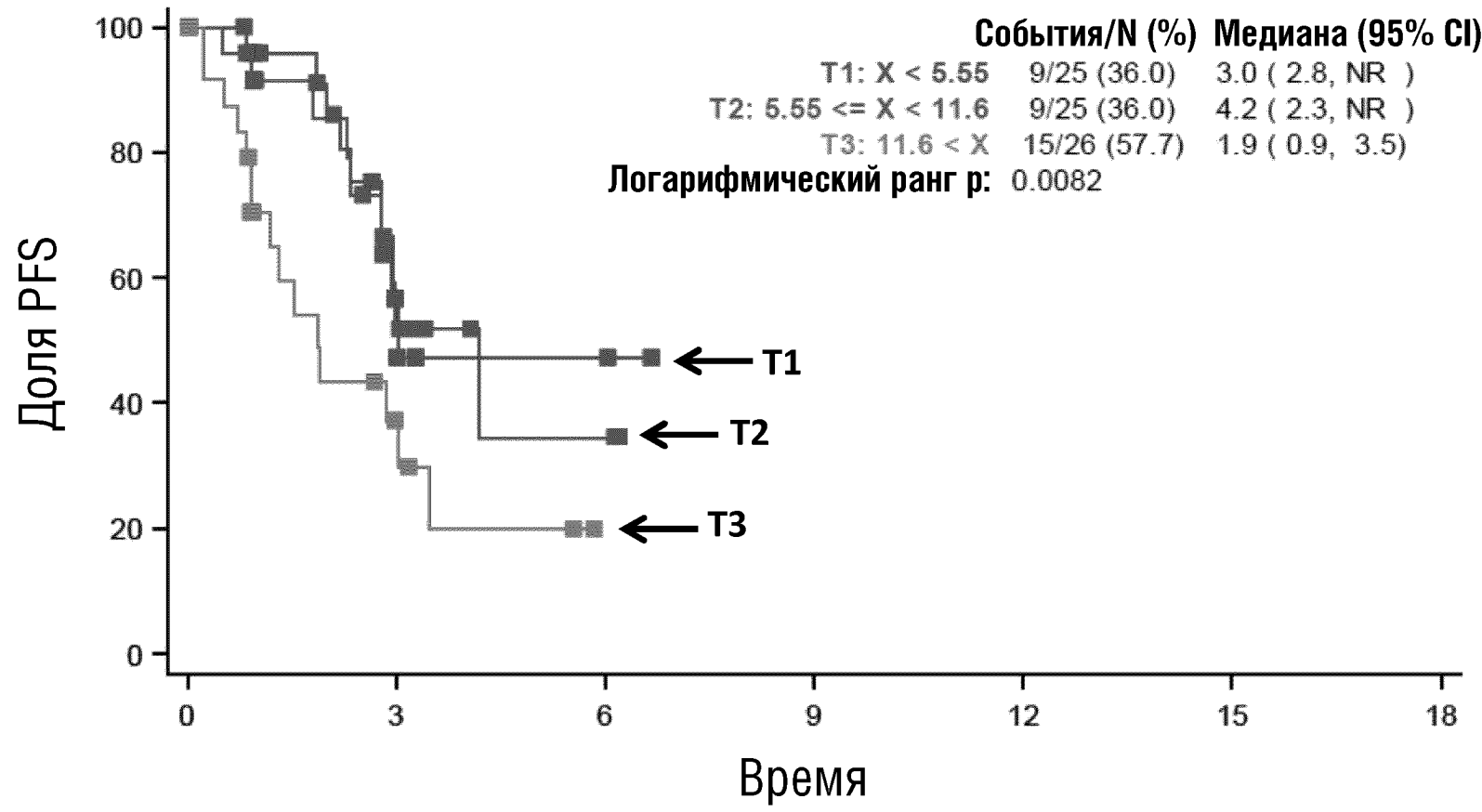
ФИГ.15

Индивидуумы с высоким SPD/CRP на исходном уровне



ФИГ.16

Тертили активированной каспазы 3 во входящих композициях
для продолжительности жизни без прогрессирования



ФИГ.17

