

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190469** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.28

(51) Int. Cl. *C12N 15/10* (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.08.09

(54) СПОСОБЫ ОЦЕНКИ ИНТЕГРИРОВАННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

(31) 62/716,972

(72) Изобретатель:

(32) 2018.08.09

Бриггз Эдриан Рэнгхэм (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2019/046048

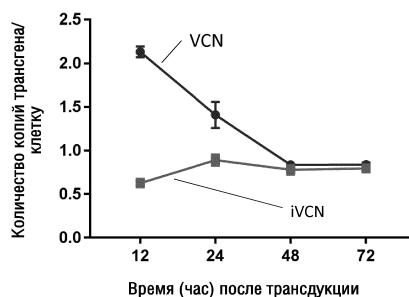
Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2020/033916 2020.02.13

(71) Заявитель:

ДЖУНО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(57) Настоящее изобретение относится к способам оценки последовательностей нуклеиновой кислоты, интегрированных в геном генетически модифицированной клетки, такой как генетически модифицированная клетка, используемая в клеточной терапии. Клетки, как правило, генетически модифицируют для экспрессии рекомбинантного белка, такого как рекомбинантный рецептор, посредством введения полинуклеотида и интеграции конкретных последовательностей в полинуклеотиде, таких как рекомбинантные последовательности, в геном клетки. В некоторых аспектах представленные способы можно использовать для установления различий интегрированных нуклеиновых кислот и неинтегрированных, остаточных нуклеиновых кислот.



A1

202190469

202190469

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567083EA/032

СПОСОБЫ ОЦЕНКИ ИНТЕГРИРОВАННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет Предварительной заявки США No. 62/716972, поданной 9 августа 2018 г., озаглавленной «METHODS FOR ASSESSING INTEGRATED NUCLEIC ACIDS», полное содержание которой приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Включение списка последовательностей в качестве ссылки

[0002] Настоящая заявка подана вместе со списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей представлен в форме файла, озаглавленного 735042016840SeqList.txt, созданного 3 августа 2019 г., имеющего размер 53,2 килобайт. Полная информация в электронном формате из списка последовательностей приведена в качестве ссылки.

Область изобретения

[0003] Настоящее изобретение относится, в некоторых аспектах, к способам оценки последовательностей нуклеиновой кислоты, интегрированных в геном генетически модифицированной клетки, такой как генетически модифицированная клетка, используемая в клеточной терапии. Клетки, как правило, генетически модифицируют для экспрессии рекомбинантного белка, такого как рекомбинантный рецептор, посредством введения полинуклеотида и интеграции конкретных последовательностей в полинуклеотиде, таких как последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, в геном клетки. В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для установления различий интегрированных нуклеиновых кислот и неинтегрированных, остаточных нуклеиновых кислот.

Уровень техники

[0004] Доступны способы определения количества копий нуклеиновых кислот, введенных для генетической инженерии клетки, например, для адоптивной клеточной терапии для лечения заболеваний и состояний. Для видов адоптивной клеточной терапии (включая виды, включающие введение клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, специфические для представляющего интерес заболевания или нарушения, такие как химерные рецепторы антигенов (CAR) и/или другие рекомбинантные рецепторы антигенов) может требоваться своевременная и точная оценка интегрированных нуклеиновых кислот, и в некоторых случаях, неинтегрированных, остаточных нуклеиновых кислот, до введения клеток субъекту. Необходимы улучшенные способы. Настоящее изобретение относится к способам и наборам, удовлетворяющим этой необходимости.

Сущность изобретения

[0005] Настоящее изобретение относится к способам оценки геномной интеграции последовательности трансгена. В некоторых из любых вариантов осуществления, способы

включают: (а) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, где указанная одна или несколько клеток содержит, или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, включающую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок; и (b) по высокомолекулярной фракции, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена, интегрированного в геном одной или нескольких клеток.

[0006] Настоящее изобретение относится к способу оценки геномной интеграции последовательности трансгена, включающему: (а) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, где указанная одна или несколько клеток содержит или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок; и (b) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена, интегрированного в геном одной или нескольких клеток.

[0007] Настоящее изобретение относится также к способам оценки геномной интеграции последовательности трансгена, включающим: (а) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, где указанная одна или несколько клеток содержит или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок; и (b) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции.

[0008] В некоторых из любых вариантов осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции, таким образом, оценка последовательности трансгена, интегрированного в геном одной или нескольких клеток.

[0009] Настоящее изобретение относится также к способам оценки геномной интеграции последовательности трансгена, включающим: (а) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, где указанная одна или несколько клеток содержит или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок; и (b) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции, где

последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции представляет собой последовательности трансгена, интегрированные в геном одной или нескольких клеток.

[0010] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции представляют собой последовательности трансгена, интегрированные в геном одной или нескольких клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена, интегрированного в геном одной или нескольких клеток, в (b) включает определение массы, веса или количества копий последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции.

[0011] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до отделения, способы включают выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из одной или нескольких клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена включает определение массы, веса или количества копий последовательности трансгена на диплоидный геном или на клетку в одной или нескольких клетках.

[0012] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, одна или несколько клеток содержит популяцию клеток, в которой множество клеток из популяции содержат последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, одна или несколько клеток содержит популяцию клеток, в которой множество клеток из популяции, как подозревают, содержат последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок.

[0013] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, количество копий представляет собой среднее или среднее арифметическое количество копий на диплоидный геном или на клетку среди популяции клеток.

[0014] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до отделения, полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, введен в клетку, например, из популяции клеток, для получения по меньшей мере одной модифицированной клетки из одной или нескольких клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, по меньшей мере одна модифицированная клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно 37°C±2°C, в течение более чем 96 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, по меньшей мере одна модифицированная клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно 37°C±2°C, в течение более чем 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, по меньшей мере одна модифицированная клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C,

необязательно, точно или приблизительно $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, в течение более чем 48 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена.

[0015] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, одна или несколько клеток криоконсервирована до отделения высокомолекулярной фракции ДНК. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, одна или несколько клеток представляет собой линию клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, одна или несколько клеток представляет собой первичную клетку, полученную из образца от субъекта. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, одна или несколько клеток представляет собой иммуноцит. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, иммуноцит представляет собой Т-клетку или клетку NK. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, Т-клетка представляет собой CD3+, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

[0016] Настоящее изобретение относится к способам оценки последовательности трансгена в биологическом образце от субъекта. В некоторых из любых вариантов осуществления, представленные способы включают: (а) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, присутствующих в биологическом образце от субъекта, где биологический образец содержит, или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок; и (b) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции, таким образом, оценку последовательностей трансгена, присутствующих во всем или части биологического образца.

[0017] Настоящее изобретение относится к способу оценки последовательности трансгена в биологическом образце от субъекта, включающему: (а) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, присутствующих в биологическом образце от субъекта, где биологический образец содержит, или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок; и (b) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции, таким образом, оценку последовательностей трансгена, присутствующих во всем или части биологического образца.

[0018] Настоящее изобретение относится к способу оценки последовательности трансгена в биологическом образце от субъекта, включающему: (а) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, присутствующих в биологическом образце от субъекта, где

биологический образец содержит, или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок; и (b) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена во всем или части биологического образца.

[0019] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в (b) включает определение массы, веса или количества копий последовательности трансгена во всем или части биологического образца.

[0020] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до отделения, выделяют ДНК из одной или нескольких клеток, присутствующих в биологическом образце. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, биологический образец получен от субъекта, которому вводили композицию, содержащую по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, биологический образец представляет собой образец ткани или образец физиологической жидкости. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, биологический образец представляет собой образец ткани, и ткань представляет собой опухоль. В некоторых вариантах осуществления, образец ткани представляет собой биоптат опухоли. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, биологический образец представляет собой образец физиологической жидкости, и образец физиологической жидкости представляет собой образец крови или сыворотки.

[0021] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до отделения, полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, введен в клетку, например, из популяции клеток, для получения по меньшей мере одной модифицированной клетки из одной или нескольких клеток.

[0022] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, одна или несколько клеток в биологическом образце содержат иммунцит. В некоторых вариантах осуществления, иммунцит представляет собой Т-клетку или клетку NK. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка представляет собой CD3+, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

[0023] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, отделение проводят посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле или эксклюзионной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, отделение проводят посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле.

[0024] Настоящее изобретение относится также к способам оценки геномной интеграции последовательности трансгена. В некоторых из любых вариантах осуществления, способы включают: (a) отделение, посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле, высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК,

выделенной из популяции клеток, где указанная популяция клеток содержит множество модифицированных клеток, каждая из которых содержит, или как подозревают, содержит, последовательность трансгена, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок; и (b) определение среднего или среднего арифметического количества копий на диплоидный геном или на клетку последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции, таким образом, оценку последовательностей трансгена, интегрированных в геном множества модифицированных клеток из популяции клеток.

[0025] Настоящее изобретение относится также к способам оценки геномной интеграции последовательности трансгена. В некоторых из любых вариантах осуществления, способы включают: (a) отделение, посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле, высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из популяции клеток, где указанная популяция клеток содержит множество модифицированных клеток, каждая из которых содержит, или как подозревают, содержит, последовательность трансгена, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок; и (b) по высокомолекулярной фракции, определение среднего или среднего арифметического количества копий на диплоидный геном или на клетку последовательности трансгена, интегрированного в геном множества модифицированных клеток из популяции клеток.

[0026] Настоящее изобретение относится к способу оценки геномной интеграции последовательности трансгена, включающему: (a) отделение, посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле, высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из популяции клеток, где указанная популяция клеток содержит множество модифицированных клеток, каждая из которых содержит, или как подозревают, содержит, последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок; и (b) определение среднего или среднего арифметического количества копий на диплоидный геном или на клетку последовательности трансгена, интегрированного в геном множества модифицированных клеток из популяции клеток.

[0027] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до отделения, полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, введен в клетку, например, из популяции клеток, для получения по меньшей мере одной из множества модифицированных клеток из популяции клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, популяция клеток не инкубирована при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно 37°C±2°C, в течение более чем 96 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, по меньшей мере в одну модифицированную клетку. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, популяция клеток не инкубирована при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно

37°C±2°C, в течение более чем 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, по меньшей мере в одну модифицированную клетку. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, популяция клеток не инкубирована при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно 37°C±2°C, в течение более чем 48 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, по меньшей мере в одну модифицированную клетку. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, популяция клеток криоконсервируется до отделения высокомолекулярной фракции ДНК.

[0028] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 15 тысяч пар оснований (т.п.о.). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 17,5 тысяч пар оснований (т.п.о.). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 20 тысяч пар оснований (т.п.о.).

[0029] В некоторых из любых вариантов осуществления, последовательность трансгена содержит регуляторный элемент, связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок.

[0030] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена проводят посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, ПЦР представляет собой количественную полимеразную цепную реакцию (qПЦР), цифровую ПЦР или капельную цифровую ПЦР. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, ПЦР представляет собой капельную цифровую ПЦР. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, ПЦР проводят с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части последовательности трансгена. В некоторых из любых вариантов осуществления, один или несколько праймеров являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации последовательности регуляторного элемента.

[0031] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена на массу или вес ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, необязательно, на микрограмм ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение количества последовательности трансгена включает оценку массы или веса последовательности трансгена в микрограммах, на микрограмм ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение количества последовательности трансгена включает оценку

массы, веса или количества копий последовательности трансгена на одну или несколько клеток, необязательно, на CD3+, CD4+ и/или CD8+ клетку, и/или на клетку, экспрессирующую рекомбинантный белок.

[0032] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена на диплоидный геном или на клетку в биологическом образце. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, количество копий представляет собой среднее или среднее арифметическое количество копий на диплоидный геном, или на клетку, среди одной или нескольких клеток в биологическом образце.

[0033] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена на объем биологического образца, необязательно, на микролитр или на миллилитр биологического образца. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена на массу тела или площадь поверхности тела субъекта. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции и нормализацию массы, веса или количества копий по массе, весу или количеству копий эталонного гена в высокомолекулярной фракции, или по стандартной кривой. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, эталонный ген представляет собой ген домашнего хозяйства. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, эталонный ген представляет собой ген, кодирующий альбумин (ALB). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, эталонный ген представляет собой ген, кодирующий субъединицу р30 белка рибонуклеазы Р (RPP30). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, количество копий эталонного гена в выделенной ДНК определяют посредством ПЦР с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части эталонного гена.

[0034] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, последовательность трансгена не кодирует полный вирусный белок gag. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, последовательность трансгена не содержит полный геном HIV, компетентный по репликации вирусный геном и/или вспомогательные гены, где вспомогательные гены, необязательно, представляют собой Nef, Vpr, Vif, Vpr и/или Vpx.

[0035] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, введение полинуклеотида проводят посредством трансдукции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления,

вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой вектор AAV, необязательно, выбранный из числа векторов AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 или AAV8.

[0036] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, введение полинуклеотида проводят посредством способа физической доставки, необязательно, посредством электропорации.

[0037] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, рекомбинантный белок представляет собой рекомбинантный рецептор. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием, или антигеном, экспрессированным в клетках из окружения очага, ассоциированного с заболеванием или состоянием. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, заболевание или состояние представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, антиген выбран из интегрина $\alpha\beta6$ (интегрин $\alpha\beta6$), антигена созреваия В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, лиганда 1 хемокинов с мотивом C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора эпидермального фактора роста с мутацией типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, подобного рецептору Fc белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), связывающего фолат белка (FBP), рецептора альфа фолата, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G-белком рецептора, класса C, группы 5, члена D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы *erb-B2*), Her3 (*erb-B3*), Her4 (*erb-B4*), димеров *erbB*, ассоциированного с меланомой высокомолекулярного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена вируса гепатита В, человеческого лейкоцитарного антигена A1 (HLA-A1), человеческого лейкоцитарного антигена A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R α), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R α 2), рецептора, содержащего домен вставки киназы (*kdr*), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 из L1-CAM, члена A семейства 8, содержащего богатые лейцином повторы (LRRC8A), Lewis Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, мышиноного цитомегаловируса (CMV), муцина 1 (MUC1),

MUC16, лигандов члена D группы 2 естественных киллеров (NKG2D), мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простатспецифического антигена, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простатспецифического мембранного антигена (PSMA), подобного рецепторной тирозинкиназе орфанного рецептора 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобластов (TPBG также известного как 5T4), опухолиассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром-таутомераза, допахром-дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфического для патогена или экспрессируемого патогеном антигена, или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул, и/или молекул, экспрессированных HIV, HCV, HBV или другими патогенами. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор.

[0038] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, CAR содержит внеклеточный узнающий антиген домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий ITAM. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий ITAM, содержит внутриклеточный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ), необязательно, цепи CD3-дзета человека. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен дополнительно содержит передающую костимулирующие сигналы область. В некоторых вариантах осуществления, передающая костимулирующие сигналы область содержит передающий сигналы домен из CD28 или 4-1BB, необязательно CD28 человека или 4-1BB человека.

[0039] Настоящее изобретение относится к способу оценки остаточной неинтегрированной последовательности трансгена, включающему: (а) осуществление способа по любому из представленных вариантов осуществления, для определения присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции ДНК, таким образом, оценку геномной интеграции последовательности трансгена; (b) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции; и (с) сравнение количества, определенного в (а), с количеством, определенным в (b), таким образом, определение количества остаточной неинтегрированной рекомбинантной последовательности.

[0040] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена включает определение массы, веса или количества копий последовательности трансгена на диплоидный геном или на клетку в одной или нескольких клетках. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, одна или несколько клеток содержит популяцию клеток, в которой множество клеток из популяции содержат последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, одна или несколько клеток содержит популяцию клеток, в которой множество клеток из популяции, как подозревают, содержат последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, количество копий представляет собой среднее или среднее арифметическое количество копий на диплоидный геном или на клетку среди популяции клеток.

[0041] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, сравнение количества включает вычитание количества копий, определенного в (a), из количества копий, определенного в (b). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, сравнение количества включает определение соотношения количества копий, определенного в (a), к количеству копий, определенному в (b).

[0042] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества в (b) проводят посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, ПЦР представляет собой количественную полимеразную цепную реакцию (qПЦР), цифровую ПЦР или капельную цифровую ПЦР. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, ПЦР представляет собой капельную цифровую ПЦР. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, ПЦР проводят с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части последовательности трансгена.

[0043] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества в (b) включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции и нормализацию массы, веса или количества копий по массе, весу или количеству копий эталонного гена в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции, или по стандартной кривой. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, эталонный ген представляет собой ген домашнего хозяйства. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, эталонный ген представляет собой ген, кодирующий альбумин (ALB). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, эталонный ген представляет собой ген, кодирующий субъединицу р30 белка рибонуклеазы Р (RPP30).

[0044] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение массы, веса или количества копий эталонного гена в выделенной ДНК проводят посредством ПЦР с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части эталонного гена.

[0045] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества в (a) и определение присутствия, отсутствия или количества в (b) проводят посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием одинакового праймера или одинакового набора праймеров.

[0046] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, остаточная неинтегрированная рекомбинантная последовательность содержит одно или несколько из векторных плазмид, линейной комплементарной ДНК (кДНК), аутоинтегрантов или колец длинного концевой повтора (LTR).

Краткое описание чертежей

[0047] На **ФИГ. 1** показано количество копий, как оценено посредством капельной цифровой ПЦР (кцПЦР) до (до геля; стандартный анализ количества копий вектора (VCN)) или после отделения фракции высокомолекулярной ДНК, выше порога 15 т.п.о., 17,5 т.п.о. или 20 т.п.о., посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле (PFGE) (анализ количества интегрированных копий вектора (iVCN)). Количество копий оценивали с использованием праймеров, специфически амплифицирующих часть интегрированных последовательностей трансгена («трансген»); упаковывающей плазмиды (вирусной упаковывающей плазмиды, кодирующей белок G вируса везикулярного стоматита Индиана («VSVg»)), или геномного контроля (гена, кодирующего субъединицу р30 белка рибонуклеазы Р («RRP30»)). Оценку проводили в образце из трансдуцированных клеток, или в нетрансдуцированном контроле, с добавлением плазмиды CAR и плазмиды VSVg. Количество копий каждого гена нормализовали по количеству диплоидных геномов (копий/диплоидный геном; с использованием праймеров, специфических для гена альбумина в качестве эталона) или на 50 нг геномной ДНК.

[0048] На **ФИГ. 2А-2В** показано количество копий, как оценено посредством стандартного анализа количества копий вектора (VCN) (в образцах геномной ДНК, которые не подвергали PFGE, содержащих как низко-, так и высокомолекулярную ДНК), и анализа количества интегрированных копий вектора (iVCN) (в образцах высокомолекулярной ДНК после PFGE) последовательностей трансгена в различных временных точках (до трансдукции («до»), через 5 минут, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа и 96 часов после трансдукции, или по завершению способа модификации, «завершение») для Т-клеток Jurkat (**ФИГ. 2А**) или первичных Т-клеток, выделенных от субъектов-людей (**ФИГ. 2В**), трансдуцированных препаратом лентивируса, содержащего последовательности трансгена, кодирующие CAR. Количество копий каждого гена

нормализовали по количеству диплоидных геномов (копий/диплоидный геном; с использованием праймеров, специфических для гена альбумина, в качестве эталона).

[0049] На **ФИГ. 3А** показано количество интегрированных копий, оцененное на сутки 3, 4 или 5 для иллюстративных не включающих размножения способов получения композиции Т-клеток, с использованием первичных Т-клеток от двух различных субъектов-людей (Донор А и Донор В), которые стимулировали посредством инкубации с (1) конъюгированными с антителом против CD3/против CD28 парамагнитными бусинами («бусины»), (2) реагентами Fab против CD3/против CD28, конъюгированными с олигомерным мутеином стрептавидина, в концентрации 4,0 мкг на 10^6 клеток, или (3) реагентами Fab против CD3/против CD28, конъюгированными с олигомерным мутеином стрептавидина, в концентрации 0,8 мкг на 10^6 клеток, инкубированными в базовых средах без сыворотки или факторов роста («базовая»), или в бессывороточных средах, содержащих IL-2, IL-5 и IL-15 («полная») после трансдукции. На **ФИГ. 3В** показана корреляция между количеством копий, как определено посредством iVCN, и процентом экспрессирующих CAR клеток (как определено посредством процента CD3+/активированная Cas3-/CAR+ клеток среди CD3+ клеток посредством проточной цитометрии).

[0050] На **ФИГ. 4А-4Е** показано количество копий на диплоидный геном, как оценено посредством стандартного VCN (без PFGE) и iVCN (с PFGE) (**ФИГ. 4А**), доля интегрированного трансгена (**ФИГ. 4В**), доля неинтегрированного трансгена (**ФИГ. 4С**), количество копий неинтегрированного трансгена на диплоидный геном (**ФИГ. 4D**) и количество интегрированных копий на CAR+ клетку (**ФИГ. 4Е**), в ходе различных иллюстративных включающих или не включающих размножения способов получения композиции Т-клеток, в которых используют различные стимулирующие реагенты и время сбора, как указано в **таблице E1**.

[0051] На **ФИГ. 5** показаны количество копий на диплоидный геном, как оценено посредством стандартного VCN (без PFGE) и iVCN (с PFGE), количество копий неинтегрированного трансгена, доля неинтегрированного трансгена и доля интегрированного трансгена, в различных временных точках в иллюстративном способе модификации, для модификации первичных Т-клеток от различных доноров для экспрессии химерного рецептора антигена (CAR). Оцененные временные точки включают от суток 0 до суток 8 включающих размножение способов, включая в размороженном материале (ТМАТ; сутки 0), при активации (АМАТ; сутки 1), при трансдукции (ХМАТ; сутки 2) или в различные периоды времени после начала культивирования (iнос+1 - iнос+6; представляющие сутки 3-8 способа).

[0052] На **ФИГ. 6** показано количество копий на диплоидный геном, как оценено посредством стандартного VCN (без PFGE) и iVCN (с PFGE) на клетку, в линии клеток фибробластов человека HT1080, через 12, 24, 48 или 72 часа после трансдукции.

[0053] На **ФИГ. 7А** показана взаимосвязь между количеством копий на клетку среди тотальных клеток, как оценено посредством стандартного VCN (без PFGE) и iVCN

(с PFGE), в композициях клеток, полученных из первичных Т-клеток от различных доноров-людей, которые были модифицированы для экспрессии CAR с использованием включающего размножение способа (○) или не включающего размножения способа (●). На **ФИГ. 7В-7С** показана взаимосвязь между количеством копий на клетку в композициях клеток, как оценено посредством стандартного VCN (**ФИГ. 7В**) или iVCN (**ФИГ. 7С**), и поверхностная экспрессия CAR, как показано по проценту экспрессирующих CAR CD3+ клеток (%CD3+CAR+) среди жизнеспособных CD45+ клеток, оцененному посредством проточной цитометрии.

Подробное описание

[0054] Настоящее изобретение относится к способам оценки интеграции последовательностей нуклеиновой кислоты, интегрированных в геном генетически модифицированной клетки. В некоторых аспектах, способы используют для определения присутствия, отсутствия и/или количества последовательностей нуклеиновой кислоты, таких как последовательности трансгена, использованные для генетической инженерии клетки. В некоторых аспектах, способы можно использовать для оценки интеграции последовательностей трансгена в геном клетки, такой как генетически модифицированная клетка, используемая в клеточной терапии. В некоторых аспектах, клетки генетически модифицируют для экспрессии рекомбинантного белка, такого как рекомбинантный рецептор, посредством введения полинуклеотида, содержащего последовательности нуклеиновой кислоты, такие как последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, подлежащие интеграции в геном клетки. В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для оценки интеграции, и различения и/или определения присутствия, отсутствия или количества интегрированных нуклеиновых кислот и неинтегрированных, остаточных нуклеиновых кислот.

[0055] В некоторых аспектах, полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, вводят в клетку с использованием различных способов доставки, таких как способы вирусной трансдукции или физической доставки, такие как электропорация. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки, такие как модифицированные клетки для адоптивной клеточной терапии, необходимо мониторировать или оценивать по различным характеристикам и свойствам, таким как определение уровня экспрессии рекомбинантного белка, кодированного последовательностями трансгена, и/или определение количества копий последовательностей трансгена, интегрированных в геном клетки, например, стабильно интегрированных в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки необходимо мониторировать по присутствию, отсутствию и/или количеству неинтегрированных, остаточных нуклеиновых кислот. В некоторых аспектах, такую оценку можно проводить в одной или нескольких временных точках в ходе способа модификации или получения. В частности, для модифицированных клеток и композиций клеток для использования в клеточной терапии, эффективное и точное определение присутствия, отсутствия, количества, количества копий и/или

экспрессии последовательностей трансгена является критическим, например, в адоптивной клеточной терапии, для обеспечения надлежащих и точных характеристики и определения модифицированных клеток, для точного определения дозирования, и для обеспечения эффективности и безопасности композиций клеток при введении субъекту. Необходимы улучшенные способы для удовлетворения таким требованиям для эффективной и точной оценки присутствия, отсутствия, количества, количества копий и/или экспрессии интегрированных и неинтегрированных, остаточных нуклеиновых кислот.

[0056] В некоторых случаях, может являться необходимым проведение оценки в ходе ранней стадии способа модификации или получения, и/или в ходе способа получения, который является укороченным или ускоренным, посредством своевременного и надежного способа. Иллюстративные укороченные или ускоренные способы получения включают способ получения без размножения, например, способ, не включающий или включающий более короткую или более ускоренную инкубацию для размножения клеток после трансдукции. В некоторых аспектах, конкретные укороченные или ускоренные способы могут включать инкубацию клеток в условиях, в которых клетки по существу не размножаются или клетки только минимально размножаются. В некоторых случаях, такие способы могут включать инкубацию клеток при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно 37°C±2°C, в течение не более чем 96, 72 или 48 часов после введения рекомбинантного или гетерологичного полинуклеотида, например, посредством трансдукции.

[0057] В некоторых случаях, определение присутствия, отсутствия и/или количества последовательностей трансгена, интегрированных в геном клетки, может являться сложным, в частности, в ранних временных точках или при использовании способов, которые не включают размножения, например, способов, имеющих более короткий период инкубации, культивирования или размножения после введения последовательностей нуклеиновой кислоты для интеграции, или более короткий период инкубации, культивирования или размножения до оценки характеристик или признаков модифицированных клеток, или до криоконсервации. В некоторых аспектах, присутствие, отсутствие или количество, определенное по ДНК, выделенной из клеток в ходе ранних стадий способа модификации или получения, или в способе, который не включает размножения, может приводить к завышенной оценке, из-за присутствия неинтегрированных молекул нуклеиновых кислот, присутствующих в реакционной смеси или в клетках. В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления позволяют специфическое определение присутствия, отсутствия или количества интегрированных нуклеиновых кислот, и в некоторых случаях, неинтегрированных, остаточных нуклеиновых кислот, до введения клеток субъекту.

[0058] Представленные варианты осуществления предлагают улучшенные решения для требований эффективной и точной оценки модифицированных клеток или композиций клеток. В частности, улучшенные способы необходимы для клеток,

модифицированных с использованием ускоренного или не включающего размножения способа, или в ранних временных точках в способе модификации. В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления основаны на наблюдении, описанном в настоящем описании, например, в примерах 3-5, что в способе анализа, включающем отделение высокомолекулярной фракции ДНК из клетки, например, более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.), и оценку присутствия, отсутствия или количества последовательностей трансгена в высокомолекулярной фракции, можно надежно детектировать интегрированные последовательности трансгена в образце. Обнаружено, что представленный способ, включающий интегрированные последовательности трансгена, отделенные от неинтегрированных, остаточных последовательностей, обеспечивает преимущество, в частности, в ходе ускоренных, не включающих размножения способов.

[0059] В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления основаны на способах отделения или выделения больших или высокомолекулярных молекул нуклеиновой кислоты, которые могут содержать геномную ДНК, от меньших или имеющих низкомолекулярных молекул нуклеиновой кислоты, которые могут содержать неинтегрированные или остаточные молекулы, такие как эписомные плазмиды, аутоинтегранты или другие фрагменты. В некоторых аспектах, высокомолекулярные молекулы нуклеиновой кислоты также включают последовательности трансгена, интегрированные в геном. Представленные варианты осуществления обеспечивают то преимущество, что их можно использовать для установления различий интегрированных последовательностей (например, интегрированных в геном клетки) от неинтегрированных, остаточных последовательностей, таким образом, позволяя точное и надежное определение интегрированных последовательностей, даже на ранних стадиях способов получения или не включающих размножения способов.

[0060] В некоторых аспектах, представленные способы позволяют эффективное и надежное определение количества копий интегрированных нуклеиновых кислот, в частности, в ранней временной точке в ходе способа модификации или получения, или для не включающих размножения, укороченных или ускоренных способов модификации или получения, таким образом, улучшение точности и надежности характеристика клеток для использования или введения в клеточной терапии. В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления обеспечивают преимущество точного определения количества интегрированных копий в конкретных временных точках, например, в ходе или в конце не включающих размножения, укороченных или ускоренных способов модификации или получения, без включения количества копий неинтегрированных или остаточных молекул, таких как эписомные плазмиды, аутоинтегранты или другие фрагменты.

[0061] В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления основаны на наблюдении, что оценка количества копий в высокомолекулярной фракции после отделения фракции может приводить к точному определению количества копий

стабильно интегрированной последовательности трансгена, в частности, для клеток, полученных с использованием не включающего размножения способа, который может сохранять свободные, неинтегрированные копии последовательностей трансгена. В отличие от этого, определение количества копий без предшествующего отделения по высокой молекулярной массе, которое не отличает интегрированные от неинтегрированных последовательностей трансгена, ограничено по точности определения количества стабильно интегрированных последовательностей трансгена, особенно в ходе и после более короткого, не включающего размножения способа. Как описано в настоящем описании, например, в примерах 3-5, в ходе ускоренного, не включающего размножения способа, способы, в которых не используют отделение высокомолекулярных фрагментов (например, названные анализом количества копий вектора (VCN)), могут приводить к ложноположительным результатам или завышенной оценке интегрированных последовательностей трансгена, поскольку неинтегрированные, остаточные молекулы (например, эписомные плазмиды, аутоинтегранты или другие фрагменты) также могут быть детектированы и подсчитаны. Варианты осуществления, представленные в настоящем описании, обеспечивают различные преимущества, поскольку они позволяют эффективное и точное определение без ложноположительных результатов или завышенной оценки, которые могут возникать в результате существующих анализов VCN.

[0062] Настоящее изобретение относится также к наборам и изделиям, которые можно использовать для осуществления представленных способов.

[0063] Полное содержание всех публикаций, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, на которые ссылаются в этой заявке, приведено в качестве ссылки для всех целей в такой же степени, как если бы содержание каждой индивидуальной публикации было индивидуально приведено в качестве ссылки. Если определение, приведенное в настоящем описании, противоречит или иным образом не соответствует определению, приведенному в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, приведенных в настоящем описании в качестве ссылки, определение, приведенное в настоящем описании, имеет преимущество перед определением, приведенным в настоящем описании в качестве ссылки.

[0064] Заголовки разделов, используемые в настоящем описании, приведены только с целью организации, и их не следует рассматривать как ограничивающие описанный объект.

I. СПОСОБЫ ОЦЕНКИ ИНТЕГРИРОВАННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

[0065] Настоящее изобретение относится к способам оценки геномной интеграции (в некоторых случаях, могут быть названы анализом количества интегрированных копий вектора (iVCN)) последовательностей трансгена, таких как последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, использованного в генетической инженерии клеток. В некоторых вариантах осуществления, способы используют для определения присутствия, отсутствия и/или количества последовательностей нуклеиновой кислоты, таких как последовательности трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, такой как

рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, способы включают определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена, интегрированного в геном одной или нескольких клеток, например, одной или нескольких генетически модифицированных клеток которые содержат, или как подозревают, содержат, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок. В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для оценки интеграции в различных временных точках до, во время или после способа модификации клетки, например, способа, использованного для введения полинуклеотидов, содержащих последовательности трансгенов, которые могут быть интегрированы в геном клетки. В некоторых аспектах, представленные способы можно также использовать для оценки биологических образцов, полученных от субъекта, которому введены модифицированные клетки, для детекции или определения присутствия, отсутствия и/или количества последовательностей трансгена в биологическом образце.

[0066] В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для оценки интеграции, и для установления различий и/или определения присутствия, отсутствия и/или количества интегрированных нуклеиновых кислот и/или неинтегрированных, остаточных нуклеиновых кислот, таких как одно или несколько из векторных плазмид, линейной комплементарной ДНК (кДНК), аутоинтегрантов или колец длинного концевой повтора (LTR). В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления включают способы оценки присутствия, отсутствия, количества копий последовательностей трансгена в биологическом образце от субъекта, которые включают выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из биологического образца от субъекта, такого как субъект, которому введены модифицированные клетки.

[0067] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам оценки геномной интеграции последовательности трансгена, которые включают отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), такой как молекулы ДНК, составляющие более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.), из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток. В некоторых аспектах, такое отделение можно осуществлять такими способами, как электрофорез в геле в пульсирующем поле (PFGE). В некоторых аспектах, одна или несколько клеток содержит, или как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок. В некоторых аспектах, последовательность трансгена интегрирована или подлежит интеграции в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления, последовательности трансгена включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок, и другие компоненты или элементы, включая регуляторные элементы, например, промоторы, транскрипционные и/или посттранскрипционные регуляторные элементы или отвечающие элементы, или маркеры, например, суррогатные

маркеры. В некоторых аспектах, способы включают определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена, интегрированного в геном одной или нескольких клеток, например, посредством количественных способов, таких как количественная полимеразная цепная реакция (qПЦР), цифровая ПЦР (цПЦР) или капельная цифровая ПЦР (кцПЦР).

[0068] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам оценки геномной интеграции последовательности трансгена, включающим отделение, посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле, высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из популяции клеток, где указанная популяция клеток содержит множество модифицированных клеток, каждая из которых содержит, или как подозревают, содержит, последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок; и определение среднего или среднего арифметического количества копий на диплоидный геном последовательности трансгена, интегрированного в геном множества модифицированных клеток из популяции клеток.

[0069] В некоторых вариантах осуществления, до отделения, полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, вводят по меньшей мере в одну из множества модифицированных клеток из популяции клеток.

[0070] В некоторых аспектах, представленные способы включают отделение конкретной фракции, такой как высокомолекулярная фракция, от других молекул или видов ДНК, присутствующих в выделенной тотальной ДНК из модифицированных клеток. В некоторых аспектах, способы включают отделение высокомолекулярной фракции, такой как содержащая ДНК размером приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) или более. В некоторых аспектах, стадию отделения осуществляют с использованием способов отделения нуклеиновых кислот на основе размера или молекулярной массы, таких как способы на основе электрофореза. В некоторых аспектах, способы включают также выделение ДНК из одной или нескольких клеток до отделения высокомолекулярной фракции из выделенной ДНК.

[0071] В некоторых аспектах, способы включают определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена, интегрированного в геном одной или нескольких клеток. В некоторых аспектах, способы включают определение присутствия, отсутствия и/или количества последовательностей трансгена в одной или нескольких из отделенных фракций, например, в высокомолекулярной фракции. В некоторых аспектах, способы включают определение присутствия, отсутствия и/или количества последовательностей трансгена в высокомолекулярной фракции. В некоторых аспектах, способы включают, по высокомолекулярной фракции, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена, интегрированного в геном одной или нескольких клеток. В некоторых аспектах, определение может быть основано на способах детекции и/или количественной оценки последовательностей нуклеиновой кислоты, таких как количественная полимеразная цепная реакция (qПЦР)

или родственные способы. В некоторых аспектах, представленные способы позволяют установить отличия интегрированной последовательности трансгена от неинтегрированных последовательностей трансгена, которые могут присутствовать в клетках или поблизости от клеток и/или в образце для анализа.

[0072] В некоторых вариантах осуществления, способы включают выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из клетки, в которую введен полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, в условиях для интеграции в геном клетки, и отделение высокомолекулярной фракции более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из выделенной ДНК. В некоторых вариантах осуществления, способы включают отделение высокомолекулярной фракции более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) от дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), выделенной из клетки, где до отделения, в клетку введен полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена в условиях для интеграции последовательности трансгена в геном клетки. В некоторых аспектах, представленные способы включают определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в отделенной высокомолекулярной фракции.

[0073] В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится также к способам определения присутствия, отсутствия или количества последовательностей трансгена в биологическом образце от субъекта, включающим выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из биологического образца от субъекта; отделение высокомолекулярной фракции более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из выделенной ДНК; и определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции. В некоторых аспектах, биологический образец получен от субъекта, которому вводили модифицированные клетки, содержащие последовательность трансгена.

[0074] В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится также к способу оценки остаточной неинтегрированной последовательности трансгена. В некоторых вариантах осуществления, способы включают проведение стадий любого из способов, включающих выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из клетки, в которую введен полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, в условиях для интеграции в геном клетки, и отделение высокомолекулярной фракции более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из выделенной ДНК; определение количества копий последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции, таким образом, оценку геномной интеграции последовательности трансгена.

[0075] В некоторых аспектах, способы включают также определение количества копий последовательности трансгена в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции, таким образом, определение общего количества копий последовательностей трансгена. В некоторых аспектах, способы включают определение количества копий остаточной неинтегрированной последовательности трансгена посредством вычитания количества копий, определенного посредством оценки

высокомолекулярной фракции, из количества копий, определенного посредством оценки тотальной выделенной ДНК (например, без разделения фракций). В некоторых аспектах, способы включают определение доли остаточной неинтегрированной последовательности трансгена посредством деления количества копий, определенного посредством оценки высокомолекулярной фракции, из определенного количества копий, на количество копий, определенное посредством оценки тотальной выделенной ДНК (например, без разделения фракций). В некоторых вариантах осуществления, остаточная неинтегрированная последовательность трансгена содержит одно или несколько из векторных плазмид, линейной комплементарной ДНК (кДНК), аутоинтегрантов или колец длинного концевой повтора (LTR).

А. Отделение высокомолекулярной фракции

[0076] В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления включают отделение нуклеиновых кислот, таких как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), полученных из модифицированных клеток, на основании их молекулярной массы или размера. В некоторых аспектах, способ включает также отделение или выделение молекул ДНК, попадающих в диапазон размера или молекулярной массы. В некоторых аспектах, конкретные типы интегрированных последовательностей трансгена или неинтегрированных последовательностей трансгена могут иметь типичный диапазон размера или молекулярной массы. В некоторых аспектах, конкретный диапазон размера или молекулярной массы можно использовать для отделения или выделения молекул ДНК с размерами или молекулярной массой в этом диапазоне. В некоторых аспектах, присутствие, отсутствие или количество последовательностей трансгена в конкретном диапазоне размера или молекулярной массы.

[0077] В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярную фракцию, например, содержащую молекулы ДНК выше порогового значения или в диапазоне размера или молекулярной массы, отделяют или выделяют. В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция в первую очередь содержит большие молекулы ДНК, такие как хромосомная или геномная ДНК, и содержит мало или почти не содержит молекул, меньших по размеру, чем пороговое значение, таких как плазмиды, неинтегрированные фрагменты ДНК, линейная комплементарная ДНК (кДНК), аутоинтегранты, кольца длинного концевой повтора (LTR) или другие остаточные виды или молекулы, которые не были интегрированы в геном. В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция в первую очередь содержит большие молекулы ДНК, такие как хромосомная или геномная ДНК, и является свободной от молекул меньших по размеру, чем пороговое значение, таких как плазмиды, неинтегрированные фрагменты ДНК, линейная комплементарная ДНК (кДНК), аутоинтегранты, кольца длинного концевой повтора (LTR) или другие остаточные виды или молекулы, которые не были интегрированы в геном. В некоторых вариантах осуществления, посредством определения присутствия, отсутствия или количества последовательностей трансгена в высокомолекулярной фракции, детектированные

последовательности трансгена представляют последовательности, интегрированные в геном модифицированной клетки, и минимизирована детекция неинтегрированных последовательностей трансгена.

[0078] В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция содержит молекулы ДНК, имеющие размер более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.). В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция содержит молекулы ДНК, имеющие размер более чем или более чем приблизительно 10, 11, 12, 12,5, 13, 14, 15, 16, 17, 17,5, 18, 19, 20, 25 или 30 тысяч пар оснований (т.п.о.), или более. В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция содержит молекулы ДНК, имеющие размер более чем или более чем приблизительно 10, 12,5, 15, 17,5 или 20 тысяч пар оснований (т.п.о.), или более. В некоторых аспектах, высокомолекулярная фракция содержит геномную ДНК или фрагменты геномной ДНК, и исключает или отделяет неинтегрированные или остаточные виды нуклеиновой кислоты, которые могут присутствовать в образце ДНК. В некоторых аспектах, высокомолекулярная фракция, например, образцы ДНК, выше порогового значения, например, приблизительно 10, 11, 12, 12,5, 13, 14, 15, 16, 17, 17,5, 18, 19, 20, 25 или 30 тысяч пар оснований (т.п.о.), или более. В некоторых вариантах осуществления, пороговое значение составляет более чем или более чем приблизительно 10, 12,5, 15, 17,5 или 20 тысяч пар оснований (т.п.о.), или более. В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 15 тысяч пар оснований (т.п.о.). В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 17,5 тысяч пар оснований (т.п.о.). В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 20 тысяч пар оснований (т.п.о.).

[0079] В некоторых аспектах, пороговое значение составляет приблизительно или составляет, или превышает в 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 или 4 раза размер введенного полинуклеотида. Например, в некоторых аспектах, если введенный полинуклеотид, содержащий последовательности трансгена, составляет или составляет приблизительно 10 т.п.о., пороговое значение может составлять или составлять приблизительно 20 т.п.о., приблизительно в два раза больше размера введенного полинуклеотида. В некоторых аспектах, с использованием порогового значения для отделения высокомолекулярной фракции, неинтегрированные последовательности, такие как линейная комплементарная ДНК (кДНК), аутоинтегранты, кольца длинного концевой повтора (LTR) или другие остаточные низкомолекулярные виды или молекулы которые не были интегрированы в геном, можно отделять от высокомолекулярных видов.

[0080] В некоторых аспектах, высокомолекулярная фракция в первую очередь содержит молекулы ДНК, которые больше, чем неинтегрированные и/или остаточные молекулы ДНК, которые могут присутствовать в способе получения и/или в модифицированной клетке, до или после завершения интеграции последовательностей трансгена. В некоторых аспектах, посредством определения присутствия, отсутствия

и/или количества последовательностей трансгена в высокомолекулярной фракции, количество копий интегрированных последовательностей можно точно определять, без включения количества копий неинтегрированных или остаточных молекул нуклеиновой кислоты, содержащих последовательности трансгена, в это число. В некоторых случаях, включение количества копий неинтегрированных или остаточных молекул нуклеиновой кислоты, содержащих последовательности трансгена, может приводить к завышенной оценке или неточному определению количества копий. В некоторых аспектах, в частности, в ходе ранних стадий способа модификации или получения, или в способе, представляющем собой не включающий размножения способ или укороченный способ, присутствие неинтегрированных или остаточных молекул может влиять на определенное количество копий.

[0081] В некоторых вариантах осуществления, способ включает отделение или выделение низкомолекулярной фракции, например, содержащей молекулы ДНК, которые меньше порогового значения. В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярная фракция может содержать молекулы ДНК, меньшие по размеру, чем пороговое значение, такие как плазмиды, неинтегрированные фрагменты ДНК, линейная комплементарная ДНК (кДНК), аутоинтегранты, кольца длинного концевой повтора (LTR) или другие остаточные виды или молекулы, которые не были интегрированы в геном. В некоторых аспектах, можно определять присутствие, отсутствие или количество последовательностей трансгена в низкомолекулярной фракции. В некоторых случаях, может являться необходимым определение присутствия, отсутствия и/или количества неинтегрированных или остаточных молекул ДНК на различных стадиях получения или модификации, например, для определения прогрессирования модификации и/или для оценки количества копий остаточных нуклеиновых кислот, таких как остаточные векторы, использованные для введения последовательностей трансгена в клетки.

[0082] В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярная фракция содержит молекулы ДНК, имеющие размер менее чем или менее чем приблизительно 20 тысяч пар оснований (т.п.о.). В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция содержит молекулы ДНК, имеющие размер менее чем или менее чем приблизительно 20, 19, 18, 17,5, 17, 16, 15, 14, 13, 12,5, 12, 11 или 10 тысяч пар оснований (т.п.о.), или менее.

[0083] В некоторых вариантах осуществления, высоко- или низкомолекулярную фракцию можно отделять или выделять с использованием способов на основе электрофореза, микроструйной техники или хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярную фракцию можно отделять или выделять с использованием электрофореза в геле в пульсирующем поле (PFGE) или эксклюзионной хроматографии.

[0084] В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярную фракцию отделяют или выделяют с использованием электрофореза в геле в пульсирующем поле (PFGE). В некоторых аспектах, PFGE включает введение чередующегося градиента

напряжения в системе электрофореза для улучшения разделения более крупных молекул нуклеиновой кислоты, таких как хромосомная или геномная ДНК. В некоторых аспектах, напряжение электрофореза периодически переключают между тремя направлениями: одним, проходящим по центральной оси геля, и двумя, проходящими под углом 60 градусов с каждой стороны. В некоторых аспектах, иллюстративные системы и способы отделения или выделения молекул нуклеиновой кислоты посредством PFGE включают описанные, например, в US 9599590; US 2017/0240882; или US 2017/0254774.

[0085] В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярную фракцию отделяют или выделяют с использованием способа на основе электрофореза. В некоторых аспектах, электрофорез разделяет биомолекулы по заряду и/или размеру посредством подвижности в разделяющем матриксе в присутствии электрического поля. В некоторых вариантах осуществления, системы электрофореза можно использовать для фракционирования, анализа и сбора конкретных аналитов, включая молекулы нуклеиновой кислоты, на основании размера или молекулярной массы. В некоторых аспектах, фракция представляет собой или включает подгруппу из множества молекул. В некоторых аспектах, фракцию можно оценивать или определять по размеру или молекулярной массе, или в некоторых аспектах, по любому физическому свойству, которое вынуждает ее мигрировать с более быстрой или более медленной скоростью, чем другие молекулы или фракции из множества, при побуждении к миграции через буферную композицию по настоящему описанию посредством силы электрического поля (т.е., электрофоретической подвижности).

[0086] В некоторых аспектах, электрофорез, такой как PFGE, можно проводить с использованием устройства или системы. В некоторых аспектах, устройство или система представляет собой автоматизированную систему или высокопроизводительную систему. Иллюстративные системы для проведения PFGE включают системы, описанные, например, в US 9599590; US 2017/0240882; или US 2017/0254774, или коммерчески доступные устройство или систему, такие как Pippin Prep, Blue Pippin или Pippin HT (Sage Science); система CHEF Mapper® XA, система CHEF-DR® III Variable Angle System, система CHEF-DR II (Bio-Rad); и система Biometra Rotaphor 8 (Analytik Jena AG).

[0087] В некоторых аспектах, иллюстративные образцы для оценки включают нуклеиновую кислоту, олигонуклеотид, молекулу ДНК, молекулу РНК или любую их комбинацию. В некоторых аспектах, образец может включать аминокислоту, пептид, белок или любую их комбинацию. В некоторых аспектах, образец может представлять собой лизат цельных клеток, или лизат фракции ДНК или белка клетки, например, лизат клеток, модифицированных для адоптивной клеточной терапии.

[0088] В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления включают выделение, отделение и анализ молекул нуклеиновой кислоты из клеток, например, клеток, модифицированных для адоптивной клеточной терапии. В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления включают выделение, отделение и анализ молекул нуклеиновой кислоты из клеток, подвергающихся различным стадиям или

ступеням генетической инженерии или способа получения. В некоторых аспектах, молекула нуклеиновой кислоты включает полимерную форму фосфатного сложного эфира рибонуклеозидов (аденозина, гуанозина, уридина или цитидина; «РНК») или дезоксирибонуклеозидов (дезоксиаденозина, дезоксигуанозина, дезокситимидина или дезоксицитидина; «ДНК»), или любые их фосфоэфирные аналоги, такие как фосфоротиоаты и тиоэфиры, либо в одноцепочечной форме, либо в двухцепочечной спирали. В некоторых аспектах, молекула нуклеиновой кислоты, и в частности, молекула ДНК или РНК, относится только к первичной и вторичной структуре молекулы, и не ограничивает ее какими-либо конкретными третичными формами. В некоторых аспектах, молекула нуклеиновой кислоты может включать двухцепочечную ДНК, обнаруженную в линейных или кольцевых молекулах ДНК (например, рестрикционные фрагменты), плазмиды и хромосомы.

[0089] В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты из образцов могут включать геномную ДНК, двухцепочечную ДНК (дцДНК), одноцепочечную ДНК (оцДНК), кодирующую ДНК (или комплементарную ДНК, кДНК), матричную РНК (мРНК), малую интерферирующую РНК (миРНК), короткошпилечную РНК (кшРНК), микроРНК (мкРНК), одноцепочечную РНК, двухцепочечную РНК (дцРНК), морфолино, молекулу для РНК-интерференции (РНКи), митохондриальную нуклеиновую кислоту, хлоропластную нуклеиновую кислоту, вирусную ДНК, вирусную РНК и другие органеллы с отдельным генетическим материалом. В некоторых аспектах, нуклеиновые кислоты из образца могут также включать аналоги нуклеиновой кислоты, которые содержат модифицированные, синтетические или неприродные нуклеотиды, или структурные элементы, или другие альтернативные/модифицированные химические группы нуклеиновой кислоты, например, аналоги оснований, такие как инозин, интеркаляторы (Патент США No. 4835263) и средства, связывающиеся с малой бороздкой (Патент США No. 5801115).

[0090] В некоторых вариантах осуществления, до выделения или отделения высоко- или низкомолекулярной фракции, образцы можно объединять с реагентом, который придает суммарный отрицательный заряд, денатурирует пептид или белок, или расщепляет молекулу ДНК или РНК до оценки в системе для электрофореза. В некоторых аспектах, образцы можно объединять с средствами, которые придают флуоресцентные, магнитные или радиоактивные свойства образцу или его фракциям с целью детекции. В некоторых примерах, образец дцДНК смешивают с бромидом этидия, наносят в кассету для электрофореза, и фракции образца детектируют с использованием ультраяркого зеленого LED.

[0091] В некоторых аспектах, система для отделения или выделения образцов нуклеиновой кислоты, такая как система для электрофореза, может являться автоматизированной и/или высокопроизводительной. В некоторых аспектах, в системе для электрофореза можно использовать одноразовые расходные материалы или реагенты, такие как кассета для электрофореза.

В. Определение присутствия, отсутствия или количества нуклеиновых кислот

[0092] В некоторых аспектах, способы включают определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в образце, таком как образец, содержащий дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) из одной или нескольких клеток, таких как популяция клеток, включающая модифицированные клетки. В некоторых аспектах, способы включают определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в образце, таком как образец, содержащий ДНК из одной или нескольких клеток, подвергающихся одной или нескольким стадиям или ступеням генетической инженерии или получения. В некоторых аспектах, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена можно проводить с использованием способов определения присутствия, отсутствия или количества последовательности нуклеиновой кислоты, например, конкретной последовательности ДНК. В частности, способы, используемые для количественной оценки последовательностей нуклеиновой кислоты, таких как количественная полимеразная цепная реакция (qПЦР) или родственные способы, можно использовать в определении количества копий последовательности трансгена в образце, содержащем ДНК, или в конкретной фракции, такой как высокомолекулярная фракция, отделенная или выделенная из образцов, содержащих ДНК. В некоторых вариантах осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена включает определение количества копий, например, с использованием любого из иллюстративных анализов, описанных ниже, для количественной оценки молекулы нуклеиновой кислоты.

[0093] В некоторых аспектах, присутствие, отсутствие и/или количество конкретной последовательности можно детектировать с использованием зонда или праймера, который может специфически связывать или узнавать всю или часть последовательности трансгена. В некоторых вариантах осуществления, количество копий можно определять с использованием зондов, которые могут специфически детектировать часть последовательности трансгена, или последовательностей праймеров, которые могут специфически амплифицировать часть последовательности трансгена. В некоторых аспектах, последовательности зонда или праймера могут специфически детектировать, связывать или узнавать часть последовательности трансгена, такую как часть последовательности трансгена, которая является гетерологичной, экзогенной или трансгенной для клетки. В некоторых аспектах, последовательности зонда или праймера могут специфически детектировать, связывать или узнавать часть последовательности трансгена, такую как часть последовательности трансгена, подлежащего интеграции или интегрированного в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления, праймеры или зонд, используемые для qПЦР или других способов на основе нуклеиновой кислоты, являются специфическими для связывания, узнавания и/или амплификации нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный белок, и/или других компонентов или элементов плазмиды и/или вектора, включая регуляторные элементы, например, промоторы,

транскрипционные и/или посттранскрипционные регуляторные элементы или отвечающие элементы, или маркеры, например, суррогатные маркеры. В некоторых вариантах осуществления, праймеры или зонды могут связываться с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими рекомбинантный белок и/или другие компоненты или элементы, такие как регуляторные элементы, включая посттранскрипционные регуляторные элементы. В некоторых из любых вариантов осуществления, один или несколько праймеров являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации последовательности регуляторного элемента, например, регуляторного элемента, функционально связанного с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок. В некоторых аспектах, зонды или праймеры можно использовать для иллюстративных способов определения присутствия, отсутствия и/или количества последовательностей трансгена, таких как количественная ПЦР (qПЦР), цифровая ПЦР (цПЦР) или капельная цифровая ПЦР (кцПЦР).

[0094] В некоторых аспектах, определение присутствия, отсутствия или количества включает определение количества последовательности трансгена, такое как определение массы, веса, концентрации или количества копий последовательностей трансгена, в одной или нескольких клетках, или в биологическом образце, содержащем одну или несколько клеток. В некоторых аспектах, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности нуклеиновой кислоты, или оценку массы, веса, концентрации или количества копий последовательностей трансгена можно проводить в части популяции клеток или в части биологического образца, и можно нормализовать, усреднять и/или экстраполировать для определения присутствия, отсутствия или количества во всем образце или во всей популяции клеток. В некоторых аспектах, количество последовательности трансгена может включать массу, вес, концентрацию или количество копий последовательности трансгена. В некоторых аспектах, масса, вес, концентрация или количество копий представляет собой среднее арифметическое массы, веса, концентрации или количества копий. В некоторых аспектах, масса, вес, концентрация или количество копий представляет собой среднее арифметическое массы, веса, концентрации или количества копий на единицу, например, на клетку, на диплоидный геном, на объем, на массу или их эквивалент, или иным образом нормализовано, экстраполировано или усреднено на единицу.

[0095] В некоторых вариантах осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена включает определение массы, веса, концентрации или количества копий последовательности трансгена на диплоидный геном или на клетку в одной или нескольких клетках. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько клеток содержит популяцию клеток, в которой множество клеток из популяции содержат последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, одна или несколько клеток содержит популяцию клеток, в которой

множество клеток из популяции, как подозревают, содержат последовательность трансгена, включающую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, количество копий представляет собой среднее или среднее арифметическое количество копий на диплоидный геном или на клетку среди популяции клеток.

[0096] В некоторых аспектах, определение количества копий включает определение количества копий последовательностей трансгена, присутствующих в одной или нескольких клетках, или в биологическом образце. В некоторых аспектах, количество копий можно выражать как среднее или среднее арифметическое количество копий. В некоторых аспектах, количество копий конкретного интегрированного трансгена включает количество интегрантов (содержащих последовательности трансгена) на клетку. В некоторых аспектах, количество копий конкретного интегрированного трансгена включает количество интегрантов (содержащих последовательности трансгена) на диплоидный геном. В некоторых аспектах, количество копий последовательности трансгена выражено как количество интегрированных последовательностей трансгена на клетку. В некоторых аспектах, количество копий последовательности трансгена выражено как количество интегрированных последовательностей трансгена на конкретный тип клетки, например, на клетку, экспрессирующую конкретный фенотипический маркер, или на клетку, экспрессирующую рекомбинантный белок, кодируемый введенным трансгеном. В некоторых аспектах, количество копий последовательности трансгена выражено как количество интегрированных последовательностей трансгена на диплоидный геном. В некоторых аспектах, одна или несколько клеток содержит популяцию клеток, в которой множество клеток из популяции содержат последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, количество копий представляет собой среднее или среднее арифметическое количество копий на диплоидный геном или на клетку среди популяции клеток.

[0097] В некоторых вариантах осуществления, определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса, концентрации или количества копий последовательности трансгена на массу или вес ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток. В некоторых аспектах, масса, вес, концентрация или количество копий последовательности трансгена выражены на микрограмм ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, например, одной или нескольких клеток в биологическом образце, полученном от субъекта или в одной или нескольких клетках, подвергаемых способу модификации. В некоторых вариантах осуществления, определение количества последовательности трансгена включает оценку массы или веса последовательности трансгена в микрограммах, на микрограмм ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток.

[0098] В некоторых вариантах осуществления, определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса, концентрации или количества копий последовательности трансгена на одну или несколько клеток, необязательно, на CD3+, CD4+ и/или CD8+ клетку, и/или на клетку, экспрессирующую рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса, концентрации или количества копий последовательности трансгена на одну или несколько клеток, необязательно, на клетки, экспрессирующие конкретный фенотипический маркер, например, необязательно, на CD3+, CD4+ и/или CD8+ клетку, на жизнеспособную клетку, на отрицательную по активированной каспазе клетку (например, aCas3-) или CD45+ клетку, и/или на клетку, экспрессирующую рекомбинантный белок. В некоторых аспектах, поверхностные маркеры или фенотипы, экспрессированные на клетке, можно определять с использованием способов на основе клеток, например, посредством проточной цитометрии или иммуноокрашивания. В некоторых аспектах, клетки, экспрессирующие рекомбинантный белок, можно определять с использованием способов на основе клеток, например, посредством проточной цитометрии или иммуноокрашивания. В некоторых аспектах, количество последовательностей трансгена можно нормализовать на количество конкретных клеток, например, на CD3+, CD4+ и/или CD8+ клетку, и/или на клетку, экспрессирующую рекомбинантный белок, или на общее количество клеток, например, на общее количество клеток в образце или на общее количество клеток, подвергаемых способу модификации. В некоторых аспектах, количество последовательностей трансгена можно нормализовать на количество конкретных клеток, таких как клетки, экспрессирующие конкретный фенотипический маркер, например, CD3+, CD4+ и/или CD8+ клетки, жизнеспособные клетки, отрицательные по активированной каспазе клетки (например, aCas3-) или CD45+ клетки, и/или на клетку, экспрессирующую рекомбинантный белок (например, на экспрессирующую CAR клетку), или на общее количество клеток, например, на общее количество клеток в образце или на общее количество клеток, подвергаемых способу модификации.

[0099] В некоторых вариантах осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса, концентрации или количества копий последовательности трансгена на диплоидный геном или на клетку в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления, количество копий представляет собой среднее или среднее арифметическое количество копий на диплоидный геном или на клетку среди одной или нескольких клеток в биологическом образце.

[0100] В некоторых вариантах осуществления, определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса, концентрации или количества копий последовательности трансгена на объем биологического образца, необязательно, на микролитр или на миллилитр биологического образца.

[0101] В некоторых вариантах осуществления, определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса, концентрации или количества копий последовательности трансгена на массу тела или площадь поверхности тела субъекта.

[0102] В некоторых вариантах осуществления, определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса, концентрации или количества копий последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции и нормализацию массы, веса, концентрации или количества копий по массе, весу, концентрации или количеству копий эталонного гена в высокомолекулярной фракции, или по стандартной кривой, такой как стандартная кривая на основе образцов, содержащих известные количество, концентрацию, массу, вес, концентрацию или количество копий последовательностей трансгена.

[0103] В некоторых вариантах осуществления, определенное количество копий выражено как нормализованное значение. В некоторых вариантах осуществления, определенное количество копий количественно оценивают как количество копий последовательности трансгена на геном или на клетку. В некоторых аспектах, значение на геном выражено как количество копий последовательности трансгена на диплоидный геном, поскольку типичная соматическая клетка, такая как Т-клетка, содержит диплоидный геном. В некоторых аспектах, определенное количество копий можно нормализовать по количеству копий известного эталонного гена в геноме клетки. В некоторых аспектах, эталонный ген представляет собой ген RRP30 (кодирующий субъединицу р30 белка рибонуклеазы Р), 18S *pPHK* (18S рибосомной РНК), 28S *pPHK* (28S рибосомной РНК), TUBA (α -тубулина), ACTB (β -актина), β 2M (β 2-микроглобулина), ALB (альбумина), RPL32 (рибосомного белка L32), TBP (связывающего последовательность ТАТА белка), CYCC (циклофилина С), EF1A (фактора элонгации 1 α), GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы), HPRT (гипоксантинфосфорибозилтрансферазы) или RPII (РНК-полимеразы II). В некоторых вариантах осуществления, определенное количество копий количественно оценивают как количество копий последовательности трансгена на микрограмм ДНК.

[0104] В некоторых аспектах, количество копий представляет собой среднее, среднее арифметическое или медианное количество копий из множества или популяции клеток, таких как множество или популяция модифицированных клеток. В некоторых аспектах, количество копий представляет собой среднее или среднее арифметическое количество копий из множества или популяции клеток, таких как множество или популяция модифицированных клеток. В некоторых аспектах, среднее или среднее арифметическое количество копий определяют из множества или популяции клеток, таких как множество или популяция клеток, подвергнутых одной или нескольким стадиям способа модификации или получения, или в композиции клеток, такой как композиция клеток для введения субъекту. В некоторых аспектах, нормализованное среднее арифметическое количество копий определяют, например, как среднее или среднее

арифметическое количество копий последовательностей трансгена, нормализованное по эталонному гену, такому как известный ген, присутствующий в двух копиях в диплоидном геноме. В некоторых аспектах, нормализация по эталонному гену, который, как правило, присутствует в двух копиях на диплоидный геном, может соответствовать количеству копий в клетке, такой как диплоидная клетка. Таким образом, в некоторых аспектах, нормализованное среднее или среднее арифметическое количество копий может соответствовать среднему арифметическому или среднему количеству копий детектированных последовательностей трансгена среди множества или популяции клеток, например, Т-клеток, которые, как правило, имеют диплоидный геном.

[0105] В некоторых вариантах осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена проводят посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых вариантах осуществления, ПЦР представляет собой количественную полимеразную цепную реакцию (qПЦР), цифровую ПЦР или капельную цифровую ПЦР, такую как любая из описанных ниже. В некоторых вариантах осуществления, присутствие, отсутствие или количество последовательности трансгена определяют посредством капельной цифровой ПЦР. В некоторых вариантах осуществления, ПЦР проводят с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части последовательности трансгена, и в некоторых случаях, одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части эталонного гена.

[0106] В некоторых аспектах, присутствие, отсутствие и/или количество последовательностей трансгена, определенное в одной или нескольких из фракций, и/или в конкретном образце, таком как тотальная ДНК, выделенная из множества или популяции модифицированных клеток, можно использовать в качестве основы для расчетов конкретных представляющих интерес соотношений или долей, таких как доля или количество неинтегрированных или остаточных молекул, например, как описано в разделе I.C. ниже.

1. Количественная ПЦР (qПЦР)

[0107] В некоторых вариантах осуществления, присутствие, отсутствие или количество последовательностей трансгена, таких как последовательности трансгена, кодирующие рекомбинантный белок, для интеграции в геном модифицированной клетки, определяют посредством количественной полимеразной цепной реакции (qПЦР; в некоторых случаях, также известной как ПЦР с детекцией в реальном времени).

[0108] В некоторых аспектах, qПЦР можно использовать для детекции накопления продукта амплификации, измеренного по мере прогрессирования реакции, в реальном времени, с количественной оценкой продукта после каждого цикла. Таким образом, в некоторых аспектах, qПЦР можно использовать для определения количества копий конкретной последовательности нуклеиновой кислоты, такой как последовательность

трансгена, в образце. В некоторых аспектах, в qПЦР используют флуоресцентную репортерную молекулу в каждой реакционной лунке, которая приводит к увеличению флуоресценции с увеличением количества продукта ДНК. В некоторых аспектах, используемые флуоресцентные химические вещества включают связывающие ДНК красители и флуоресцентно меченные специфические для последовательности праймеры или зонды. В некоторых аспектах, в qПЦР используют специализированный термоциклер со способностью освещать каждый образец при указанной длине волны и детектировать флуоресценцию, излучаемую возбужденным флуорофором. В некоторых аспектах, измеренная флуоресценция является пропорциональной общему количеству ампликона; изменение флуоресценции с течением времени используют для расчета количества ампликона, полученного в каждом цикле.

[0109] В некоторых аспектах, qПЦР позволяет определение исходного количества копий конкретной ДНК (амплификацию последовательности-мишени, например, последовательности трансгена, кодирующего рекомбинантный белок) с точностью и высокой чувствительностью в широком динамическом диапазоне. В некоторых аспектах, посредством qПЦР можно получать результаты, которые являются качественными (присутствие или отсутствие последовательности) или количественными (количество копий).

2. Цифровая ПЦР (цПЦР)

[0110] В некоторых вариантах осуществления, присутствие, отсутствие или количество последовательностей трансгена, таких как последовательности трансгена, кодирующие рекомбинантный белок, для интеграции в геном модифицированной клетки, определяют с использованием цифровой полимеразной цепной реакции (цПЦР). В некоторых аспектах, цПЦР позволяет определение присутствия, отсутствия или количества конкретной последовательности, такой как последовательность трансгена, с высокой точностью и чувствительностью.

[0111] В некоторых вариантах осуществления, цПЦР представляет собой способ для детекции и количественной оценки нуклеиновых кислот, и позволяет точный количественный анализ и высокочувствительную детекцию молекулы-мишени нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах, цПЦР включает предельное разведение ДНК в последовательности индивидуальных реакций ПЦР (или разделений). В некоторых аспектах, в предельном разведении можно использовать принципы разделения с использованием наножидкостных способов и эмульсионных химических реакций, на основании случайного распределения нуклеиновой кислоты-матрицы, подлежащей оценке, например, последовательности трансгена, и статистики Пуассон для измерения количеств присутствующей ДНК для данной доли положительных разделений. В некоторых аспектах, цПЦР, как правило, является линейной и является чувствительной, способной к детекции или количественной оценке очень малых количеств ДНК. В некоторых аспектах, цПЦР позволяет абсолютную количественную оценку образца ДНК с использованием способа подсчета отдельных молекул без стандартной кривой, и

абсолютную количественную оценку можно получать по ПЦР для одного разделения на лунку (см. Pohl et al., (2004) *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4(1), 41-47).

[0112] В некоторых аспектах, цПЦР можно использовать для получения множества разделений, например, тысяч разделений, для проведения множества индивидуальных реакций ПЦР параллельно. В некоторых аспектах, образец разделяют таким образом, чтобы индивидуальные молекулы нуклеиновой кислоты в образце были локализованы и концентрированы внутри многих отдельных областей. Планшеты с микролунками, капилляры, микро- или наножидкостные способы, масляную эмульсию, эмульсионные химические реакции и/или массивы миниатюризованных камер со связывающими нуклеиновую кислоту поверхностями можно использовать для разделения образцов. Иллюстративные композиции для проведения цПЦР могут включать нуклеиновую кислоту-матрицу (например, выделенную ДНК из модифицированных клеток), зонды с гасителем флуоресценции, праймеры и готовую смесь для ПЦР, содержащую ДНК-полимеразу, dNTP, $MgCl_2$ и реакционные буферы в оптимальных концентрациях. Раствор для ПЦР разделяют на меньшие реакционные смеси и затем выполняют ПЦР индивидуально. Разделения образца позволяют оценивать количество различных молекул посредством допущения, что популяция молекул следует распределению Пуассона, таким образом, с учетом возможности нахождения множества молекул-мишеней в одном разделении.

[0113] В некоторых аспектах, цПЦР включает анализ результатов цифровым способом (поскольку полученный сигнал имеет бинарное значение: «0» или «1»). В некоторых аспектах, цПЦР можно использовать для анализа большого объема, анализировать различные образцы в одно и то же время, и множество оценок можно проводить в одно и то же время. В некоторых аспектах, для цифровой ПЦР, каждое разделение, содержащее образец последовательности-матрицы (например, потенциально содержащее последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок) подготавливают таким образом, чтобы разводить до среднего количества копий последовательности 0,5-1. Разведение является важным для получения надежных результатов для количественной оценки, для сигналов, кажущихся соответствующими распределению Пуассона. В каждую лунку распределяют праймеры для амплификации, специфические для тестируемой последовательности (например, части последовательностей трансгена), и флуоресцентный зонд, и проводят эмульсионную ПЦР. В некоторых аспектах, лунку, для которой показан флуоресцентный сигнал, подсчитывают как значение «1», поскольку образец, имеющий количество копий последовательности 1, распределен в лунку, и для него показан сигнал после амплификации, и лунку, для которой не показано сигнала, подсчитывают как «0», поскольку образец, не содержащий копий последовательности, распределен в лунку, и для него не показано сигнала из-за отсутствия амплификации. С использованием закона Пуассона для малых количеств, распределение молекул-мишеней в образце можно точно

аппроксимировать, позволяя абсолютную количественную оценку последовательностей-мишеней в продукте ПЦР.

[0114] Иллюстративные коммерчески доступные устройства или системы для цПЦР включают систему для цифровой ПЦР Raindrop™ (Raindance™ Technologies); систему для капельной цифровой ПЦР QX200™ (Bio-Rad); систему BioMark™ HD и qdPCR 37K™ IFC (Fluidigm Corporation), и систему для цифровой ПЦР QuantStudio™ 3D (Life Technologies™) (см., например, Huggett et al. (2013) *Clinical Chemistry* 59: 1691-1693; Shuga, et al. (2013) *Nucleic Acids Research* 41(16): e159; Whale et al. (2013) *PLoS One* 3: e58177).

3. Капельная цифровая ПЦР (кцПЦР)

[0115] В некоторых вариантах осуществления, присутствие, отсутствие или количество последовательностей трансгена, таких как последовательности трансгена, кодирующие рекомбинантный белок, для интеграции в геном модифицированной клетки, определяют с использованием капельной цифровой полимеразной цепной реакции (кцПЦР). кцПЦР представляет собой тип цифровой ПЦР, в которой раствор для ПЦР подразделяют или разделяют на меньшие реакционные смеси посредством химических реакций в эмульсии масло-вода, для получения многочисленных капель. В некоторых аспектах, конкретные поверхностно-активные вещества можно использовать для получения капель вода-в-масле. (см., например, Hindson et al., (2011) *Anal Chem* 83(22): 8604-8610; Pinheiro et al., (2012) *Anal Chem* 84, 1003-1011). В некоторых аспектах, в каждой индивидуальной капле затем проводят индивидуальную реакцию. В некоторых аспектах, образец для ПЦР разделяют на образцы нанолитрового размера и инкапсулируют в масляные капли. В некоторых аспектах, масляные капли получают с использованием генератора капель, который прилагает вакуум к каждой из лунок. В иллюстративном случае, приблизительно 20000 масляных капель для индивидуальных реакций можно получить из объем образца 20 мкл.

[0116] В некоторых аспектах, после ПЦР, каждую каплю анализируют или считывают для определения фракции положительных по ПЦР капель (например, бинарное «0» или «1» приписывают каждой капле, на основании флуоресцентного сигнала) в исходном образце. Затем данные анализируют с использованием статистики Пуассона для определения концентрации последовательности ДНК-мишени в исходном образце. Распределение Пуассона копий молекулы-мишени на каплю (CPD) можно определять на основании фракции флуоресцентных капель (p), представленной функцией $CPD = -\ln(1-p)$. Эта модель может прогнозировать, что по мере того, как количество образцов, содержащих по меньшей мере одну молекулу-мишень, увеличивается, вероятность для образцов, содержащих более одной молекулы-мишени, увеличивается.

С. Иллюстративные применения

[0117] В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для оценки модифицированных клеток и композиций клеток, содержащих модифицированные клетки, для множества применений для оценки интеграции последовательностей

нуклеиновой кислоты и/или характеристики модифицированных клеток. Например, способы можно использовать после модификации, до получения состава, до введения и/или при введении, и/или в различных стадиях и/или временных точках способа модификации или получения, для характеристики интеграции нуклеиновых кислот, таких как последовательности трансгена, и/или модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, способы можно использовать в композициях клеток, содержащих одну или несколько модифицированных клеток.

[0118] В некоторых вариантах осуществления, представленные способы можно осуществлять в одной или нескольких стадиях или временных точках в ходе способа получения, включая момент до того как модифицированные клетки или композиции клеток, содержащие модифицированные клетки, выпущены для инфузии, готовы для введения субъекту и/или введены субъекту. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки или композиции клеток выпущены для инфузии, готовы для введения субъекту и/или введены субъекту после проведения оценки одного или нескольких из представленных способов, например, для части, фракции и/или образца модифицированных клеток или композиций клеток. В конкретных вариантах осуществления, модифицированные клетки или композиции клеток выпущены для инфузии, готовы для введения субъекту, и/или введены субъекту после того, как определено, что клетки являются безопасными, например, стерильными и/или свободными, и/или имеют желательные биологические характеристики после завершения одного или нескольких способов, такие как содержание менее или более требуемого порогового количества копий интегрированных последовательностей трансгена.

[0119] В некоторых аспектах, полинуклеотид, содержащий последовательности трансгена, вводят в клетку с использованием различных способы доставки, таких как вирусная трансдукция. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки, такие как модифицированные клетки для адоптивной клеточной терапии, необходимо мониторировать или оценивать по различным характеристикам и свойствам, таким как определение уровня экспрессии рекомбинантного белка, кодированного последовательностями трансгена, и/или определение количества копий последовательностей трансгена, интегрированных в геном клетки, например, стабильно интегрированных в геном клетки. В некоторых аспектах, такую оценку можно проводить в одной или нескольких временных точках в ходе способа модификации или получения.

[0120] В некоторых вариантах осуществления, представленные способы можно использовать для оценки или определения фармакокинетических параметров и/или биодоступности модифицированных клеток после введения модифицированной клетки или композиции клеток субъекту, такому как субъект, имеющий заболевание или состояние, для терапии. В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать в качестве суррогата для характеристики персистенции, размножения и/или количества модифицированных клеток, таких как модифицированные клетки с введенной

последовательностью трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор.

[0121] В некоторых аспектах, ниже описаны иллюстративные применения представленных способов. В некоторых аспектах, варианты способов и/или комбинацию с другими способами оценки или характеристики модифицированных клеток или композиций модифицированных клеток также можно использовать для определения признаков и характеристик модифицированных клеток для клеточной терапии.

1. Оценка интеграции последовательностей трансгена

[0122] В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способам оценки геномной интеграции последовательностей трансгена, таких как последовательности трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для оценки временных рамок, степени или прогрессирования интеграции последовательностей трансгена в геном клетки, после введения полинуклеотида, содержащего последовательности трансгена, в условиях для интеграции в клетку, например, для генетической инженерии. В некоторых вариантах осуществления, в некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для оценки временных рамок, степени или прогрессирования интеграции последовательностей трансгена в геном клетки, после введения полинуклеотида, содержащего последовательности трансгена, в условиях для интеграции в клетку, во время или после одной или нескольких ступеней или стадий способа модификации или получения. В некоторых аспектах, оцененное количество копий интегрированных последовательностей трансгена представляет собой среднее количество копий интегрированных последовательностей трансгена в множестве или популяции клеток.

[0123] В некоторых вариантах осуществления, способы включают: (а) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, где указанные одна или несколько клеток содержит, или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, включающую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок; (b) по высокомолекулярной фракции, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена, интегрированного в геном одной или нескольких клеток. В некоторых вариантах осуществления, последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции представляют собой последовательности трансгена, интегрированные в геном одной или нескольких клеток.

[0124] В некоторых вариантах осуществления, способы включают (а) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, где указанная одна или несколько клеток содержит или, как подозревают, содержит по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующую рекомбинантный белок; и (b) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции, таким образом, оценку последовательности трансгена, интегрированной в геном одной или нескольких клеток.

[0125] В некоторых из любых вариантов осуществления, последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции представляют собой последовательности трансгена, интегрированные в геном одной или нескольких клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена, интегрированного в геном одной или нескольких клеток, в (b) включает определение массы, веса или количества копий последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции.

[0126] Настоящее изобретение относится также к способам оценки геномной интеграции последовательности трансгена. В некоторых из любых вариантах осуществления, способы включают: (a) отделение, посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле, высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из популяции клеток, где указанная популяция клеток содержит множество модифицированных клеток, каждая из которых содержит, или как подозревают, содержит, последовательность трансгена, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок; и (b) определение среднего или среднего арифметического количества копий на диплоидный геном или на клетку последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции, таким образом, оценку последовательностей трансгена, интегрированных в геном множества модифицированных клеток из популяции клеток.

[0127] Настоящее изобретение относится также к способам оценки геномной интеграции последовательности трансгена. В некоторых из любых вариантах осуществления, способы включают: (a) отделение, посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле, высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из популяции клеток, где указанная популяция клеток содержит множество модифицированных клеток, каждая из которых содержит, или как подозревают, содержит, последовательность трансгена, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок; и (b) по высокомолекулярной фракции, определение среднего или среднего арифметического количества копий на диплоидный геном или на клетку последовательности трансгена, интегрированного в геном множества модифицированных клеток из популяции клеток.

[0128] В некоторых аспектах, количество копий интегрированных последовательностей нуклеиновой кислоты можно определять посредством оценки количества копий конкретной последовательности нуклеиновой кислоты, такой как все или часть последовательностей трансгена, присутствующих в высокомолекулярной

фракции образца дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), полученного из клетки или множества или популяции клеток. В некоторых аспектах, высокомолекулярная фракция содержит геномную ДНК или фрагменты геномной ДНК, и исключает или отделяет неинтегрированные или остаточные виды нуклеиновой кислоты, которые могут присутствовать в образце ДНК. В некоторых аспектах, высокомолекулярная фракция, например, образцы ДНК, превышают пороговое значение, такое как приблизительно 10, 11, 12, 12,5, 13, 14, 15, 16, 17, 17,5, 18, 19, 20, 25 или 30 тысяч пар оснований (т.п.о.), или более. В некоторых вариантах осуществления, пороговое значение составляет более чем или более чем приблизительно 10, 12,5, 15, 17,5 или 20 тысяч пар оснований (т.п.о.), или более. В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 15 тысяч пар оснований (т.п.о.). В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 17,5 тысяч пар оснований (т.п.о.). В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 20 тысяч пар оснований (т.п.о.).

[0129] В некоторых вариантах осуществления, способы включают выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из клетки, в которую введен полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, в условиях для интеграции в геном клетки, и отделение высокомолекулярной фракции более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из выделенной ДНК. В некоторых вариантах осуществления, способы включают отделение высокомолекулярной фракции более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), выделенной из клетки, где до отделения, в клетку введен полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, в условиях для интеграции последовательности трансгена в геном клетки. В некоторых аспектах, представленные способы включают определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в отделенной высокомолекулярной фракции.

[0130] В некоторых вариантах осуществления, способы включают выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из клетки, в которую введен полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, в условиях для интеграции в геном клетки; отделение высокомолекулярной фракции более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из выделенной ДНК; и определение присутствия, отсутствия или количества копий последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции.

[0131] В некоторых аспектах, фракцию интегрированных последовательностей трансгена определяют посредством деления количества интегрированных копий (как определено посредством кцПЦР после PFGE, например, анализа количества интегрированных копий вектора (iVCN), описанного в настоящем описании) на общее количество копий (как определено посредством кцПЦР без PFGE, например, посредством стандартного анализа количества копий вектора (VCN)). В некоторых аспектах, другие показатели можно использовать для сравнения или нормализации,

например, нормализованные по количеству копий эталонного гена, или по сравнению с экспрессией рекомбинантного рецептора, как детектировано способами детекции экспрессия белка, например, по сравнению с количеством CAR+ клеток в популяции, как оценено посредством проточной цитометрии.

[0132] В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способам оценки геномной интеграции последовательностей трансгена, таких как последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способам оценки геномной интеграции последовательностей трансгена, содержащих последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способам оценки геномной интеграции последовательностей трансгена, таких как последовательность трансгена, включающая регуляторные элементы, например, промоторы, транскрипционные и/или посттранскрипционные регуляторные элементы или отвечающие элементы, или маркеры, например, суррогатные маркеры, сцепленные с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок. В некоторых из любых вариантов осуществления, последовательность трансгена содержит регуляторный элемент, связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок. В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для оценки временных рамок, степени или прогрессирования генетической инженерии, например, посредством интеграции последовательностей трансгена в геном клетки, после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, в условиях для интеграции в клетку, например, для генетической инженерии. В некоторых аспектах, оцененное количество копий интегрированных последовательностей трансгена представляет собой среднее количество копий интегрированных последовательностей трансгена в множестве или популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетка присутствует в популяции клеток, которые имеют введенный полинуклеотид, кодирующий последовательность трансгена, где способ осуществляют для множества клеток в популяции.

[0133] В некоторых аспектах, представленные способы можно осуществлять в различных временных точках, ступенях или стадиях, или с использованием разнообразных различных образцов для определения и сравнения временных рамок, степени или прогрессирования генетической инженерии, например, интеграции введенных последовательностей трансгена в геном клетки, в которую введены последовательности трансгена. В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для оценки временных рамок и степени интеграции последовательности трансгена, например, посредством эксперимента по определению зависимости от времени, где образцы ДНК получают в различных временных точках после введения полинуклеотида, кодирующего последовательность трансгена. В некоторых аспектах, способы можно осуществлять на различных стадиях способа модификации или получения

для композиций модифицированных клеток. Например, представленные способы можно осуществлять на различных стадиях включающего размножение способа модификации или не включающего размножения способа модификации.

[0134] В некоторых аспектах, введение полинуклеотида проводят любым из способов, описанных в настоящем описании, таких как способы, описанные в разделе II.C и II.D в настоящем описании. В некоторых аспектах, введение полинуклеотида проводят посредством вирусной трансдукции. В некоторых аспектах, введение полинуклеотида проводят посредством способа физической доставки, необязательно, посредством электропорации.

[0135] В некоторых аспектах, способы можно использовать для определения временной точки, в которой по большей части или по существу вся интеграция завершена. В некоторых аспектах, эту временную точку можно использовать для оценки количества интегрированных копий, например, в соответствии со способами, представленными в настоящем описании, в композиции модифицированных клеток, такой как композиция модифицированных клеток для адоптивной клеточной терапии. В некоторых аспектах, способы можно использовать для определения временной точки, в которой по большей части или по существу вся интеграция не завершена, и/или остаточные, неинтегрированные последовательности присутствуют в клетках или композиции клеток.

[0136] В некоторых аспектах, способы можно использовать для определения подходящей длительности инкубации клетки после введения полинуклеотидов, содержащих последовательности трансгена, при которой по большей части или по существу вся интеграция завершена. В некоторых аспектах, способы позволяют определение подходящей длительности инкубации, которая может максимизировать интеграцию, но еще уменьшает истощение модифицированных клеток. В некоторых аспектах, клетка или популяция, или множество клеток не инкубированы при температуре более чем 25°C в течение более чем 48, 54, 60, 66 или 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, в клетку. В некоторых аспектах, клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C в течение более чем 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, в клетку. В некоторых аспектах, клетка не инкубирована при температуре более чем приблизительно 30°C и менее чем приблизительно 40°C в течение более чем 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, в клетку.

[0137] В некоторых вариантах осуществления, клетка не криоконсервирована после введения полинуклеотида и определения присутствия, отсутствия и/или количества последовательностей трансгена.

[0138] В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способам оценки геномной интеграции последовательности трансгена, включающим отделение высокомолекулярной фракции более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), выделенной из клетки, где до отделения, в клетку введен полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена,

в условиях для интеграции последовательности трансгена в геном клетки посредством вирусной трансдукции, и клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C в течение более чем 48, 54, 60, 66 или 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, в клетку; и определения присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции.

[0139] В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способам оценки геномной интеграции последовательности трансгена, включающим выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из клетки, в которую введен полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, в условиях для интеграции в геном клетки посредством вирусной трансдукции, и клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C в течение более чем 48, 54, 60, 66 или 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, в клетку; отделение высокомолекулярной фракции более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из выделенной ДНК; и определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции.

2. Оценка количества остаточной неинтегрированной ДНК

[0140] В некоторых аспектах, настоящее изобретение также относится к способам оценки остаточной неинтегрированной последовательности трансгена. В некоторых вариантах осуществления, способы включают проведение стадий любого из способов, включая выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из клетки, в которую введен полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, в условиях для интеграции в геном клетки и отделение высокомолекулярной фракции, такой как образцы ДНК выше порогового значения, описанного в настоящем описании, такого как более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.), из выделенной ДНК; определение массы, веса, концентрации или количества копий последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции, таким образом, оценку геномной интеграции последовательности трансгена.

[0141] В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способам оценки остаточной неинтегрированной последовательности трансгена. В некоторых вариантах осуществления, способы включают проведение стадий для определения присутствия, отсутствия или количества последовательностей трансгена, как описано в настоящем описании, для определения массы, веса, концентрации или количества копий последовательностей трансгена в высокомолекулярной фракции ДНК. В некоторых вариантах осуществления, способы включают также определение массы, веса, концентрации или количества копий последовательности трансгена в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции, таким образом, определение общего количества копий последовательности трансгена; В некоторых вариантах осуществления, способы включают сравнение массы, веса, концентрации или количества копий, определенных в высокомолекулярной фракции, с массой, весом, концентрацией или

количеством копий, определенными в тотальной выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции, таким образом, определение массы, веса, концентрации или количества копий остаточной неинтегрированной рекомбинантной последовательности.

[0142] В некоторых вариантах осуществления, сравнение включает вычитание массы, веса, концентрации или количества копий, определенных для высокомолекулярной фракции, из массы, веса, концентрации или количества копий, определенных без отделения высокомолекулярной фракции. В некоторых вариантах осуществления, сравнение включает определение соотношения массы, веса, концентрации или количества копий, определенных для высокомолекулярной фракции, и массы, веса, концентрации или количества копий, определенных без отделения высокомолекулярной фракции.

[0143] В некоторых вариантах осуществления, определение количества копий без отделения высокомолекулярной ДНК проводят посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР), такой как любая, описанная в настоящем описании, например, в разделе I.B. В некоторых вариантах осуществления, определение количества копий без отделения высокомолекулярной ДНК проводят с использованием способов описанных, например, в Charrier et al., *Gene Therapy* (2011) 18, 479-487; Christodoulou et al., *Gene Therapy* (2016) 23, 113-118; Zhao et al., *Human Gene Therapy Methods* (2017) 28(4): 205-214; и Milone et al., *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* (2018) 8:210-221. В некоторых аспектах, количество копий без отделения высокомолекулярной ДНК включает стандартные анализы количества копий вектора (VCN).

[0144] В некоторых вариантах осуществления, ПЦР представляет собой количественную полимеразную цепную реакцию (qПЦР), цифровую ПЦР или капельную цифровую ПЦР. В некоторых вариантах осуществления, ПЦР представляет собой капельную цифровую ПЦР. В некоторых вариантах осуществления, ПЦР проводят с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части последовательности трансгена. В некоторых из любых вариантов осуществления, один или несколько праймеров являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации всех или части последовательностей в трансгене, который интегрирован или подлежит интеграции в геном. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько праймеров являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации части последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько праймеров являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации последовательностей регуляторного элемента, функционально связанного с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько праймеров являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации последовательности регуляторного элемента, функционально связанного с

последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько праймеров являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации последовательностей посттранскрипционного регуляторного элемента, функционально связанного с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько праймеров являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации последовательностей посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурков (WPRE), функционально связанного с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок.

[0145] В некоторых вариантах осуществления, определение количества копий без отделения высокомолекулярной фракции включает оценку количество копий последовательности трансгена в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции и нормализацию количества или концентрации по эталонному гену в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции, или по стандартной кривой, например, для известного количества копий. В некоторых вариантах осуществления, эталонный ген представляет собой ген домашнего хозяйства. В некоторых вариантах осуществления, эталонный ген представляет собой ген, кодирующий альбумин (ALB). В некоторых вариантах осуществления, эталонный ген представляет собой ген, кодирующий субъединицу р30 белка рибонуклеазы Р (RPP30).

[0146] В некоторых вариантах осуществления, количество копий эталонного гена в выделенной ДНК определяют посредством ПЦР с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части эталонного гена.

[0147] В некоторых вариантах осуществления, определение количества копий в высокомолекулярной фракции и определение количества копий без отделения высокомолекулярной фракции проводят посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием одинакового праймера или одинакового набора праймеров.

[0148] В некоторых аспектах, способы включают также определение количества копий последовательности трансгена в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции, таким образом, определение общего количества копий последовательностей трансгена. В некоторых аспектах, способы включают определение количества копий остаточной неинтегрированной последовательности трансгена посредством вычитания количества копий, определенного посредством оценки высокомолекулярной фракции, из количества копий, определенного посредством оценки тотальной выделенной ДНК (например, без разделения фракций). В некоторых аспектах, способы включают определение доли остаточной неинтегрированной последовательности трансгена посредством деления количества копий, определенного посредством оценки высокомолекулярной фракции, на количество копий, определенное посредством количества копий, определенного посредством оценки тотальной выделенной ДНК

(например, без разделения фракций). В некоторых вариантах осуществления, остаточная неинтегрированная последовательность трансгена содержит одно или несколько из векторных плазмид, линейной комплементарной ДНК (кДНК), аутоинтегрантов или колец длинного концевой повтора (LTR).

[0149] В некоторых аспектах, фракцию интегрированных последовательностей трансгена можно определять посредством деления количества интегрированных копий (как определено посредством кцПЦР после PFGE, например, анализа количества интегрированных копий вектора (iVCN), описанного в настоящем описании) на общее количество копий (как определено посредством кцПЦР без PFGE, например, посредством стандартного анализа количества копий вектора (VCN)). В некоторых вариантах осуществления, фракцию неинтегрированных последовательностей трансгена можно определять как 1 - (фракция интегрированных последовательностей трансгена). В некоторых аспектах, количество копий неинтегрированной последовательности трансгена можно определять посредством вычитания количества интегрированных копий из общего количества копий.

3. Оценка количества последовательностей трансгена в образце от субъекта, которому введены модифицированные клетки

[0150] В некоторых аспектах, настоящее изобретение также относится к способам оценки присутствия, отсутствия или количества последовательностей трансгена в биологическом образце от субъекта. В некоторых аспектах, субъекту введены модифицированные клетки, например, иммунциты, модифицированные посредством введения полинуклеотидов, содержащих последовательности трансгена, в клетки, например, для адоптивной клеточной терапии. В некоторых аспектах, способы включают выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из биологического образца от субъекта; отделение высокомолекулярной фракции более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из выделенной ДНК; и определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции. В некоторых аспектах, биологический образец получен от субъекта, которому вводили модифицированные клетки, содержащие последовательность трансгена. В некоторых аспектах, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена включает определение количества копий, например, определение количества копий в биологическом образце, полученном от субъекта.

[0151] Настоящее изобретение относится к способам оценки последовательности трансгена в биологическом образце от субъекта. В некоторых из любых вариантов осуществления, представленные способы включают: (а) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, присутствующих в биологическом образце от субъекта, где биологический образец содержит, или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, включающую

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок; и (b) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции, таким образом, оценку последовательностей трансгена, присутствующих во всем или части биологического образца.

[0152] Настоящее изобретение относится к способу оценки последовательности трансгена в биологическом образце от субъекта, включающему: (a) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, присутствующих в биологическом образце от субъекта, где биологический образец содержит, или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, включающую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок; и (b) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции, таким образом, оценку последовательностей трансгена, присутствующих во всем или части биологического образца.

[0153] В некоторых вариантах осуществления, представленные способы оценки последовательности трансгена в биологическом образце от субъекта включают отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, присутствующих в биологическом образце от субъекта, где биологический образец содержит, или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок; и определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена во всем или части биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, до отделения, полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, введен по меньшей мере в одну модифицированную клетку из одной или нескольких клеток. В некоторых вариантах осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена включает определение массы, веса, концентрации или количества копий последовательности трансгена во всем или части биологического образца.

[0154] В некоторых вариантах осуществления, способ можно использовать в качестве основы для определения фармакокинетических (PK) или фармакодинамических (PD) параметров введенных клеток. В некоторых аспектах, PK или PD параметры можно измерять на основании способа на основе нуклеиновой кислоты, например, оценки присутствия, отсутствия или количества последовательностей трансгена, например, в соответствии со способами, представленными в настоящем описании. В некоторых аспектах, PK и PD параметры можно измерять на основании измерения клеточных свойств или фенотипов, например, посредством детекции экспрессии рекомбинантного белка на поверхности клеток или фенотипов или активности поверхности клеток. В некоторых аспектах, можно использовать множество способов, включая комбинацию

способов на основе нуклеиновой кислоты и способов на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления, способы включают выделение ДНК из одной или нескольких клеток, присутствующих в биологическом образце, до отделения высокомолекулярной фракции.

[0155] В некоторых вариантах осуществления, биологический образец получен от субъекта, которому вводили композицию, содержащую по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена. В некоторых вариантах осуществления, биологический образец представляет собой образец ткани или образец физиологической жидкости, или любой другой образец, полученный от субъекта, описанного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, биологический образец представляет собой образец ткани, и ткань представляет собой опухоль. В некоторых вариантах осуществления, образец ткани представляет собой биоптат опухоли. В некоторых вариантах осуществления, биологический образец представляет собой образец физиологической жидкости, и образец физиологической жидкости представляет собой образец крови или сыворотки.

[0156] В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько клеток в биологическом образце содержат иммуноцит, включая любой иммуноцит или их популяцию, описанные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, иммуноцит представляет собой Т-клетку или клетку NK. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка представляет собой CD3+, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, или любую такую клетку, имеющую конкретный фенотип.

[0157] В некоторых аспектах, можно использовать любой из способов определения присутствия, отсутствия или количества последовательностей трансгена и любой из способов нормализации или количественной оценки для определения массы, веса, концентрации или количества копий последовательностей, описанных в настоящем описании.

[0158] В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать в качестве основы для оценки воздействия, количества, концентрации, персистенции и пролиферации Т-клеток, например, Т-клеток, введенных для терапии на основе Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, воздействие, или длительное размножение и/или персистенцию клеток, и/или изменения фенотипов клеток или функциональной активности клеток, например, клеток, введенных для иммунотерапии, например, Т-клеточной терапии, в способах, представленных в настоящем описании, можно измерять посредством оценки характеристик Т-клеток *in vitro* или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления, такие анализы можно использовать для определения или подтверждения функции Т-клеток, используемых для иммунотерапии, например, Т-клеточной терапии, до или после проведения клеточной терапии, например, с использованием модифицированных Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

[0159] В некоторых аспектах, воздействие, количество, концентрация, персистенция и пролиферация связаны с фармакокинетическими параметрами. В

некоторых случаях, фармакокинетику можно оценивать посредством измерения таких параметров, как максимальная (пиковая) концентрация в плазме ($C_{\text{макс.}}$), пиковое время (т.е., когда возникает максимальная концентрация в плазме ($C_{\text{макс.}}$); $T_{\text{макс.}}$), минимальная концентрация в плазме (т.е. минимальная концентрация в плазме между дозами лекарственного средства, например, CAR+ T-клеток; $C_{\text{мин.}}$), время полувыведения ($T_{1/2}$) и площадь под кривой (т.е., площадь под кривой, полученной при нанесении на график времени против концентрации в плазме лекарственного средства модифицированных клеток; AUC), после введения. Концентрацию конкретного лекарственного средства, например, модифицированных клеток, в плазме после введения можно измерять с использованием представленных способов. Например, в некоторых аспектах, количество копий интегрированной последовательности трансгена можно оценивать в образцах, таких как образцы крови от субъекта. В некоторых аспектах, другие способы для определения PK, такие как способы на основе проточной цитометрии или других анализов, таких как иммуноанализ, ELISA или анализы на основе хроматографии/масс-спектрометрии, можно использовать в комбинации или параллельно для определения одного или нескольких фармакокинетических параметров. Другие способы детекции и/или экстраполяции до общих количеств клеток включают способы, описанные в 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.

[0160] В некоторых вариантах осуществления, фармакокинетику (PK) введенных клеток, например, композиции модифицированных клеток, определяют для оценки доступности, например, биодоступности, введенных клеток. В некоторых вариантах осуществления, «воздействие» может относиться к воздействию на организм лекарственного средства, например, модифицированных клеток, в плазме (крови или сыворотке) после введения лекарственного средства в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления воздействие можно указывать, как площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства от времени (AUC), как определено посредством фармакокинетического анализа после введения дозы лекарственного средства, например, модифицированных клеток. В некоторых случаях, AUC выражают в клетках*сутки/мкл, для клеток, вводимых в клеточной терапии, или в соответствующих им единицах. В некоторых вариантах осуществления, AUC измеряют как среднее арифметическое AUC в популяции пациентов, такой как выборка популяции пациентов, например, среднее арифметическое AUC для одного или нескольких пациента(пациентов). В некоторых вариантах осуществления, системное воздействие относится к площади под кривой (AUC) в пределах определенного периода времени, например, 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 недели 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более, или месяца 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 48 или более. В некоторых вариантах осуществления, AUC измеряют как AUC от суток 0 до суток 28 (AUC_{0-28}) после введения лекарственного средства, например, модифицированных клеток, включая все измеренные данные и данные, экстраполированные из измеренных фармакокинетических (PK) параметров, таких как среднее арифметическое AUC для популяции пациентов, такой как выборка популяции пациентов. В некоторых вариантах осуществления, для определения воздействия с течением времени, например, AUC для конкретного периода времени, например, AUC_{0-28} , получают кривую зависимости концентрации лекарственного средства от времени, с использованием множества измерений или оценки параметров, например, концентраций клеток, с течением времени, например, измерений, полученных каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21 или 28 суток, или более.

[0161] В некоторых вариантах осуществления, детектируют присутствие, отсутствие и/или количество последовательностей трансгена у субъекта после введения Т-клеток и до, во время и/или после проведения терапии. В некоторых вариантах осуществления, присутствие, отсутствие и/или количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, экспрессирующих CAR клеток, введенных для терапии на основе Т-клеток), у субъекта после введения Т-клеток и до, во время и/или после проведения терапии. В некоторых аспектах, любой из способов, описанных в настоящем описании для оценки интеграции последовательностей трансгена, можно использовать для оценки количества клеток, экспрессирующих рекомбинантный белок (например, модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, введенных для терапии на основе Т-клеток) в образце крови или сыворотки, или органа, или ткани (например, из участка заболевания, например, в образце опухоли) субъекта. В некоторых аспектах, персистенцию количественно оценивают как количество копий интегрированных последовательностей трансгена на диплоидный геном, на объем или площадь образца, например, крови или сыворотки, на микрограмм тотальной ДНК, или как количество модифицированных клеток (например, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток) на микролитр образца, например, крови или сыворотки, или на общее количество мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) или лейкоцитов, или Т-клеток на микролитр образца.

[0162] В некоторых вариантах осуществления, праймеры или зонды, используемые для любого из представленных способов, являются специфическими для связывания, узнавания и/или амплификации нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный рецептор, и/или другие компоненты или элементы плазмиды и/или вектора, включая регуляторные элементы, например, промоторы, транскрипционные и/или посттранскрипционные регуляторные элементы, или отвечающие элементы, или маркеры, например, суррогатные маркеры. В некоторых вариантах осуществления, праймеры могут являться специфическими для регуляторных элементов. В некоторых вариантах осуществления, праймеры являются специфическими для регуляторного элемента, функционально связанного с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей

рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, праймеры являются специфическими для амплификации всего или части посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурков (WPRE), функционально связанного с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор.

[0163] В некоторых вариантах осуществления, последовательности трансгена клеток детектируют у субъекта через или по меньшей мере через 4, 14, 15, 27 или 28 суток после введения модифицированных клеток. В некоторых аспектах, клетки детектируют через или по меньшей мере через 2, 4 или 6 недель, 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 модифицированных клеток.

[0164] В некоторых вариантах осуществления, пиковые уровни и/или AUC оценивают, и/или образец получают от субъекта на время, которое составляет по меньшей мере 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 суток после начала введения генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления пиковые уровни и/или AUC оценивают, и/или образец получают от субъекта на время, которое составляет между или между приблизительно 11 и 22 суток, 12 и 18 суток или 14 и 16 суток, включая каждое, после начала введения генетически модифицированных клеток.

[0165] Воздействие, например, количество или концентрацию модифицированных клеток, введенных для адоптивной клеточной терапии, показательные для размножения и/или персистенции, можно указывать применительно к максимальному количеству копий последовательностей трансгена, или максимальным количествам или концентрациям клеток, воздействию которых подвергают субъекта, длительности присутствия поддающихся детекции клеток или клеток выше определенного количества или процента, площади под кривой (AUC) для количества копий последовательностей трансгена, количества или концентрации клеток в зависимости от времени, и/или к их комбинациям и показателям. Такие исходы можно оценивать с использованием представленных способов детекции количества копий последовательностей трансгена, кодирующих рекомбинантный белок, по сравнению с общим количеством нуклеиновой кислоты или ДНК в конкретном образце, например, крови, сыворотки, плазмы или ткани, таком как образец опухоли, и/или анализов проточной цитометрии, детектирующих клетки, экспрессирующие рецептор, как правило, с использованием антител, специфических для рекомбинантного белка. Анализы на основе клеток также можно использовать для детекции количества или процента, или концентрации функциональных клеток, таких как клетки, способные к связыванию и/или нейтрализации и/или индукции ответов, например, цитотоксических ответов, против клеток, связанных с заболеванием или состоянием, или экспрессирующих антиген, узнаваемый рекомбинантным белком, таким как рекомбинантный рецептор.

[0166] В некоторых аспектах, увеличенное воздействие клеток на субъекта включает увеличение размножения клеток. В некоторых вариантах осуществления, экспрессирующие рецептор клетки, например, экспрессирующие CAR клетки, размножаются у субъекта после введения Т-клеток, например, экспрессирующих CAR Т-клеток.

[0167] В некоторых вариантах осуществления, клетки, экспрессирующие рецептор, поддаются детекции в сыворотке, плазме, крови или ткани, например, образце опухоли, субъекта, например, посредством представленных способов или способа детекции на основе проточной цитометрии, через по меньшей мере 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 модифицированных клеток, в течение по меньшей мере точно 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 модифицированных клеток.

[0168] В некоторых аспектах, масса, вес, концентрация или количество копий интегрированных последовательностей трансгена, на 100 клеток, например, в периферической крови или костном мозге, или другом компартменте, как измерено посредством любого из описанных способов, может составлять по меньшей мере 0,01, по меньшей мере 0,1, по меньшей мере 1, или по меньшей мере 10, через приблизительно 1 неделю, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 5 недель или по меньшей мере приблизительно 6 недель, или по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 2 или 3 года после введения модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество копий последовательностей трансгена 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 на время приблизительно 1 неделя, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели или по меньшей мере приблизительно 4 недели после введения модифицированных клеток, или по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 2 или 3 года после такого введения.

[0169] В некоторых аспектах, последовательности трансгена, введенные в модифицированные клетки, могут поддаваться детекции посредством описанных способов в плазме, сыворотке, крови, ткани субъекта и/или в пораженном заболеванием участке его организма, например, в участке опухоли, на время, которое составляет по меньшей мере приблизительно 3 месяца, по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере приблизительно 1 год, по меньшей мере приблизительно 2 года, по меньшей мере приблизительно 3 года, или более чем 3 года, после введения клеток, например, после начала введения Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, измеряют площадь под кривой (AUC) для концентрации клеток с рекомбинантным белком в жидкости, плазме, сыворотке, крови,

ткани, органе и/или пораженном заболеванием участке, например, участке опухоли, у субъекта с течением времени после введения модифицированной клетки.

II. СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДА, СОДЕРЖАЩЕГО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ТРАНСГЕНА

[0170] В некоторых вариантах осуществления, представленные способы оценки интегрированных нуклеиновых кислот используют или проводят в связи с генетически модифицированными клетками, и один или несколько раз в ходе способа модификации или производства для получения генетически модифицированных клеток. В некоторых аспектах, клетка или множество клеток, для которых осуществляют или проводят представленные способы, включают клетки, которые были подвергнуты генетической инженерии или находятся в процессе генетической инженерии, и которые можно использовать в клеточной терапии, такой как адоптивная клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления, клетка или множество клеток, для которых осуществляют или проводят представленные способы, включают клетки на различных ступенях или стадиях модификации. В некоторых аспектах, клетки включают иммунциты, такие как Т-клетки, которые были модифицированы для экспрессии рекомбинантного белка, например, посредством введения полинуклеотида, содержащего последовательности трансгена, которые включают последовательности, кодирующие рекомбинантный белок. В некоторых аспектах, представленные способы используют для оценки интеграции таких последовательностей трансгена в геном модифицированной клетки.

[0171] В некоторых аспектах, способ получения или модификации включает одну или несколько стадий, включая стимуляцию, активацию, трансдукцию, размножение, культивирование или пролиферацию клеток, включая иммунциты, такие как Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы оценки интегрированных нуклеиновых кислот можно осуществлять в качестве части способа получения или продукции генетически модифицированных клеток, таких как генетически модифицированные Т-клетки.

[0172] В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления используют в способе получения или модификации, который является укороченным, ускоренным или не включает стадию размножения, например, с использованием способа получения без размножения. В некоторых аспектах, укороченный или ускоренный способ получения включает укороченную или ускоренную стадию размножения, или не включает стадию размножения, после введения нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, укороченный или ускоренный способ получения включает способы, в которых клетки не инкубированы при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно 37°C±2°C, в течение более чем 96 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, по меньшей мере в одну модифицированную клетку.

[0173] В некоторых вариантах осуществления, представленные способы используют в связи с клетками, подвергнутыми одной или несколькими стадиям или

способам, включенным в производство, получение или продукцию клеток или композиций клеток для клеточной терапии. В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для оценки интеграции нуклеиновых кислот, таких как последовательности трансгена, использованные для модификации клеток. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение клеток, таких как Т-клетки, модифицированные для экспрессии рекомбинантного белка, такого как рекомбинантный рецептор, например, химерный рецептор антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько стадий включают выделение, разделение, отбор, активацию или стимуляцию, трансдукцию, культивирование, размножение, промывку, суспендирование, разведение, концентрирование и/или составление клеток.

[0174] В некоторых вариантах осуществления, способы получения или продукции материала для клеточной терапии включают выделение клеток от субъекта, подготовку, переработку, культивирование, в одном из стимулирующих условий. В некоторых вариантах осуществления, способ включает стадии переработки, проводимые в порядке, в котором: клетки, например, первичные клетки, сначала выделяют, например, отбирают или отделяют, из биологического образца; отобранные клетки инкубируют с вирусными препаратами для трансдукции (например, вирусными препаратами, содержащими полинуклеотиды, которые включают последовательности трансгена для интеграции), необязательно, после стадии стимуляции выделенных клеток в присутствии стимулирующего реагента; культивирование трансдуцированных клеток, например, для размножения клеток; составление трансдуцированных клеток в композицию и введение композиции в сосуд для биомедицинского материала.

[0175] В некоторых вариантах осуществления, способы получения или модификации могут включать одно или несколько из (a) промывки биологического образца, содержащего клетки (например, образца цельной крови, образца лейкоцитарной пленки, образца моноклеарных клеток периферической крови (PBMC), образца нефракционированных Т-клеток, образца лимфоцитов, образца лейкоцитов, продукта афереза или продукта лейкоафереза), (b) выделения, например, отбора, из образца желательной подгруппы или популяции клеток (например, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки), например, посредством инкубации клеток с селективным или иммуноаффинным реагентом для разделения на основании иммуноаффинности; (c) введения средства, кодирующего рекомбинантный рецептор, например, CAR, в выделенные или отобранные клетки, например, посредством инкубации выделенных, например, отобранных клеток, с частицами вирусного вектора, кодирующими рекомбинантный рецептор, (d) культивирования, культивации или размножения клеток, например, с использованием способов, как описано, и (e) составления трансдуцированных клеток, например, в фармацевтически приемлемом буфере, криоконсерванте или другой пригодной среде. В некоторых вариантах осуществления, способы могут дополнительно включать (f) стимуляцию клеток посредством подвергания клеток воздействию стимулирующих условий, которую можно проводить до, во время и/или после инкубации клеток с

частицами вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько дополнительных стадий промывки или стадий суспендирования, например, для разведения, концентрирования и/или обмена буфера клеток, можно также проводить до или после любой из вышеуказанных стадий. В некоторых аспектах, полученную композицию модифицированных клеток вводят в один или несколько сосудов для биомедицинской культуры.

[0176] В некоторых вариантах осуществления, представленные способы получения или продукции генетически модифицированных клеток осуществляют таким образом, что одну, несколько или все стадии при подготовке клеток для клинического использования, например, в адоптивной клеточной терапии, осуществляют без подвергания клеток воздействию нестерильных условий и без необходимости использования стерильного помещения или шкафа. В некоторых вариантах осуществления такого способа, клетки выделяют, отделяют или отбирают, трансдуцируют, промывают, необязательно, активируют или стимулируют, и составляют, все в пределах закрытой системы. В некоторых аспектах такого способа, клетки извлекают из закрытой системы и вводят в один или несколько сосудов для биомедицинского материала. В некоторых вариантах осуществления, способы осуществляют в автоматическом режиме. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько стадий проводят вне закрытой системы или устройства.

[0177] В некоторых вариантах осуществления, закрытую систему используют для проведения одной или нескольких из других стадий переработки способа изготовления, получения или продукции средства для клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько, или все из стадий переработки, например, выделение, отбор и/или обогащение, переработку, инкубацию в сочетании со стадиями трансдукции и модификации, и составления, проводят с использованием системы, устройства, или аппарата в интегрированной или автономной системе, и/или в автоматизированном или программируемом режиме. В некоторых аспектах, система или устройство включает компьютер и/или компьютерную программу в коммуникации с системой или устройством, позволяющие пользователю программировать, контролировать, оценивать исход и/или корректировать различные аспекты стадий переработки, выделения, модификации и составления. В одном примере, система представляет собой систему, как описано в WO2009/072003, US 20110003380 или WO2016/073602.

А. Выделение или отбор клеток

[0178] В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые модифицируют, такие как клетки или композиции клеток, которые оценивают или анализируют представленными способами, представляют собой первичные клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой иммунциты или обогащенные иммунциты. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой Т-клетки или являются обогащенными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, клетки, подлежащие оценке или анализу с использованием представленных способов,

представляют собой Т-клетки или являются обогащенными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой CD4+ Т-клетки или обогащенные CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой CD8+ Т-клетки или обогащенные CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, способ изготовления, получения или продукции средства для клеточной терапии включает стадию, на которой тотальные Т-клетки, например, CD3+ или CD4+/CD8+ Т-клетки, выделяют или отбирают из образца, полученного от субъекта-человека, перед проведением последующих стадий способа.

[0179] В некоторых вариантах осуществления, способ модификации или получения включает стадии для выделения клеток или их композиций из биологических образцов, таких как образцы, полученные или происходящие от субъекта, такого как субъект, который имеет конкретное заболевание или состояние, или который нуждается в клеточной терапии, или которого собираются подвергнуть клеточной терапии. В некоторых аспектах, субъект представляет собой человека, такого как субъект, который является пациентом, нуждающимся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделены, переработаны и/или модифицированы. Соответственно, клетки, в некоторых вариантах осуществления, представляют собой первичные клетки, например, первичные клетки человека. В некоторых вариантах осуществления, клетки содержат CD4+ и CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетки содержат CD4+ или CD8+ Т-клетки. Образцы включают ткани, жидкость и другие образцы, отобранные непосредственно от субъекта. Биологический образец может представлять собой образец, полученный непосредственно из биологического источника, или образец, который является переработанным. Биологические образцы включают, но без ограничения, жидкости организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая происходящие из них переработанные образцы.

[0180] В некоторых аспектах, образец представляет собой кровь или происходящий из крови образец, или представляет собой продукт афереза или лейкоафереза, или получен из продукта афереза или лейкоафереза. Иллюстративные образцы включают цельную кровь, моноклеарные клетки периферической крови (РВМС), лейкоциты, костный мозг, тимус, биоптат ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, ассоциированную с кишечником лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистой оболочкой лимфоидную ткань, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, ободочную кишку, почку, поджелудочную железу, молочную железу, кость, предстательную железу, шейку матки, яички, яичники, миндалину или другой орган, и/или происходящие из него клетки. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологических и аллогенных источников.

[0181] В некоторых примерах, клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, посредством афереза или лейкоафереза. Образцы, в некоторых аспектах, содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах, содержит клетки, отличные от эритроцитов и тромбоцитов.

[0182] В некоторых вариантах осуществления, клетки крови, собранные от субъекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы и для помещения клеток в подходящий буфер или среды для последующих стадий переработки. В некоторых вариантах осуществления, клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления, в растворе для промывки отсутствует кальций и/или магний, и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах, стадию промывки осуществляют с использованием полуавтоматизированной «проточной» центрифуги (например, устройства для переработки клеток Cobe 2991, Baxter), в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах, стадию промывки осуществляют посредством проточной фильтрации вдоль потока (TFF), в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления, клетки ресуспендируют во множестве биосовместимых буферов после промывки, например, в таком как не содержащий $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ PBS. В конкретных вариантах осуществления, компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки напрямую ресуспендируют в культуральных средах.

[0183] В некоторых вариантах осуществления, способы получения включают стадии замораживания, например, криоконсервации, клеток, либо до, либо после выделения, отбора и/или обогащения, и/или инкубации для трансдукции и модификации. В некоторых вариантах осуществления, на стадии замораживания и последующего размораживания удаляют гранулоциты и, до некоторой степени, моноциты в популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки суспендируют в растворе для замораживания, например, после стадии промывки для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах, можно использовать любой из множества известных растворов и параметров для замораживания. Затем это разводят 1:1 средой, так чтобы конечные концентрации DMSO и HSA составляли 10% и 4%, соответственно. Клетки, как правило, затем замораживают до -80°C со скоростью 1° в минуту и сохраняют в паровой фазе в сосуде для хранения с жидким азотом.

[0184] В некоторых вариантах осуществления, выделение клеток или популяций включает одну или несколько стадий получения и/или не основанного на аффинности разделения клеток. В некоторых примерах, клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или нескольких реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения желательных компонентов, лизиса или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах, клетки отделяют на основании одного или нескольких свойств, таких как плотность, адгерентные свойства, размер, чувствительность и/или устойчивость к конкретным компонентам. В

некоторых вариантах осуществления, способы включают способы разделения клеток на основании плотности, такие как получение лейкоцитов из периферической крови посредством лизиса эритроцитов и центрифугирования в градиенте перколлы или фиколла.

[0185] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть стадии отбора включает инкубацию клеток с реагентом для отбора. Инкубацию с реагентом или реагентами для отбора, например, в качестве части способов отбора, можно осуществлять с использованием одного или нескольких реагентов для отбора, для отбора одного или нескольких различных типов клеток на основании экспрессии или присутствия в или на клетке одной или нескольких специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать любой известный способ с использованием реагента или реагентов для отбора для разделения на основании таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления, реагент или реагенты для отбора приводят к разделению, которое представляет собой разделение на основании аффинности или иммуноаффинности. Например, отбор, в некоторых аспектах, включает инкубацию с реагентом или реагентами для разделения клеток и популяций клеток на основании экспрессии или уровня экспрессии в клетках одного или нескольких маркеров, как правило, поверхностных маркеров клеток, например, посредством инкубации с антителом или партнером по связыванию, которые специфически связываются с такими маркерами, за которой, как правило, следуют стадии промывки и отделения клеток, связавшихся с антителом или партнером по связыванию, от клеток, не связавшихся с антителом или партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления, отбор и/или другие аспекты способа являются такими, как описано в WO 2015/164675.

[0186] В некоторых аспектах таких способов, некоторый объем клеток смешивают с некоторым количеством желательного реагента для отбора на основании аффинности. Отбор на основании иммуноаффинности можно проводить с использованием любых системы или способа, которые приводят к энергетически выгодному взаимодействию между отделяемыми клетками и молекулой, специфически связывающейся с маркером на клетке, например, антителом или другим партнером по связыванию на твердой поверхности, например, частице. В некоторых вариантах осуществления, способы осуществляют с использованием частиц, таких как бусины, например, магнитные бусины, покрытые средством для отбора (например, антителом), специфическим для маркера клеток. Частицы (например, бусины) можно инкубировать или смешивать с клетками в контейнере, таком как пробирка или пакет, во время встряхивания или перемешивания, с постоянным соотношением плотности клеток и частиц (например, бусин), чтобы способствовать стимуляции энергетически выгодных взаимодействий. В других случаях, способы включают отбор клеток, в котором весь или часть отбора проводят во внутренней полости камеры для центрифугирования, например, при вращении центрифуги. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию клеток с реагентами для отбора, такими

как реагенты для отбора на основании иммуноаффинности, проводят в камере для центрифугирования. В конкретных вариантах осуществления, выделение или разделение проводят с использованием системы, устройства или аппарата, описанных в WO2009/072003, US 20110003380 или WO2016/073602.

[0187] В некоторых вариантах осуществления, посредством проведения таких стадий отбора или их частей (например, инкубации с покрытыми антителами частиц, например, магнитных бусин) в полости камеры для центрифугирования, пользователь является способным контролировать конкретные параметры, такие как объем различных растворов, добавление раствора в ходе переработки и его расписание, которые могут обеспечивать преимущества, по сравнению с другими доступными способами. Например, возможность уменьшать объем жидкости в полости в ходе инкубации может увеличивать концентрацию частиц (например, бусин с реагентом), используемых в отборе, и таким образом, химический потенциал раствора, без влияния на общее количество клеток в полости. Это, в свою очередь может усиливать попарные взаимодействия между перерабатываемыми клетками и частицами, используемыми для отбора. В некоторых вариантах осуществления, проведение стадии инкубации в камере, например, при ассоциации с системами, схемой и контролем, как описано в настоящем описании, позволяет пользователю осуществлять встряхивание раствора в желательные период(ы) времени в ходе инкубации, что также может улучшать взаимодействие.

[0188] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть стадии отбора проводят в камере для центрифугирования, что включает инкубацию клеток с реагентом для отбора. В некоторых аспектах таких способов, некоторый объем клеток смешивают с некоторым количеством желательного реагента для отбора на основании аффинности, которое намного меньше, чем обычно используют при проведении сходных отборов в пробирке или контейнере для отбора такого же количества клеток и/или объема клеток, согласно инструкциям производителя. В некоторых вариантах осуществления, используют количество реагента или реагентов для отбора, составляющее/составляющие не более чем 5%, не более чем 10%, не более чем 15%, не более чем 20%, не более чем 25%, не более чем 50%, не более чем 60%, не более чем 70% или не более чем 80% от количества такого же реагента(реагентов) для отбора, используемого для отбора клеток при инкубации на основе пробирки или контейнера для такого же количества клеток и/или для такого же объема клеток согласно инструкциям производителя.

[0189] В некоторых вариантах осуществления, для отбора, например, отбора клеток на основании иммуноаффинности, клетки инкубируют в полости камеры в композиции, которая также содержит буфер для отбора, с реагентом для отбора, таким как молекула, которая специфически связывается с поверхностным маркером на клетке, которую желательно обогащать и/или истощать, но не на других клетках в композиции, такая как антитело, которое, необязательно, связано с каркасом, таким как полимер или поверхность, например, бусина, например, магнитная бусина, такая как магнитные бусины, связанные с моноклональными антителами, специфическими для CD4 и CD8. В

некоторых вариантах осуществления, как описано, реагент для отбора добавляют к клеткам в полость камеры в количестве, значительно меньшем (например, составляющим не более чем 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% количества), по сравнению с количеством реагента для отбора, которое, как правило, используют или которое может являться необходимым для достижения приблизительно такой же или сходной эффективности отбора такого же количества клеток или такого же объема клеток, когда отбор проводят в пробирке с встряхиванием или вращением. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят с добавлением буфера для отбора для клеток и реагента для отбора, для достижения целевого объема с инкубацией реагента, например, 10 мл - 200 мл, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере, или приблизительно, или 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 150 мл или 200 мл. В некоторых вариантах осуществления, буфер для отбора и реагент для отбора предварительно смешивают до добавления к клеткам. В некоторых вариантах осуществления, буфер для отбора и реагент для отбора по отдельности добавляют к клеткам. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию для отбора проводят в условиях периодического осторожного перемешивания, которое может способствовать стимуляции энергетически выгодных взаимодействий и таким образом, позволяет использование меньшего общего количества реагента для отбора, с достижением в то же время высокой эффективности отбора.

[0190] В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность инкубации с реагентом для отбора составляет от точно или приблизительно 5 минут до 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.

[0191] В некоторых вариантах осуществления, инкубацию, как правило, проводят в условиях перемешивания, например, в присутствии вращения, как правило, при относительно низких ускорении или скорости, такой как скорость, ниже, чем используют для осаждения клеток, например, от точно или приблизительно 600 об./мин до 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 для образца или стенки камеры или другого контейнера от точно или приблизительно 80 g до 100 g (например, точно или приблизительно, или по меньшей мере при 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах осуществления, вращение проводят с использованием повторяющихся интервалов вращения при такой низкой скорости с последующим периодом покоя, например, вращение и/или покой в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, вращение в течение приблизительно 1 или 2 секунд с последующим покоем в течение приблизительно 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0192] В некоторых вариантах осуществления, такой способ осуществляют в полностью закрытой системе, в которую встроена камера. В некоторых вариантах осуществления, этот способ (и в некоторых аспектах, также одну или несколько дополнительных стадий, таких как предшествующая стадия промывки образца,

содержащего клетки, такого как образец после афереза), проводят автоматизированным способом, так что клетки, реагент и другие компоненты закачивают в камеру и вытесняют из камеры в соответствующие периоды времени, и проводят центрифугирование, так что стадии промывки и связывания завершают в одной закрытой системе с использованием автоматизированной программы.

[0193] В некоторых вариантах осуществления, после инкубации и/или перемешивания клеток и реагента и/или реагентов для отбора, инкубированные клетки подвергают разделению для отбора клеток, на основании присутствия или отсутствия конкретного реагента или реагентов. В некоторых вариантах осуществления, разделение проводят в той же самой закрытой системе, в которой проводили инкубацию клеток с реагентом для отбора. В некоторых вариантах осуществления, после инкубации с реагентами для отбора, инкубированные клетки, включая клетки, с которыми связан реагент для отбора, переносят в систему для разделения клеток на основании иммуноаффинности. В некоторых вариантах осуществления, система для разделения на основании иммуноаффинности представляет собой или содержит магнитную колонку для разделения.

[0194] Такие стадии разделения могут быть основаны на положительном отборе, в котором клетки, связавшиеся с реагентами, например, антителом или партнером по связыванию, сохраняют для дальнейшего использования, и/или на отрицательном отборе, в котором клетки, не связавшиеся с реагентом, например, антителом или партнером по связыванию, сохраняют. В некоторых примерах, обе фракции сохраняют для дальнейшего использования. В некоторых аспектах, отрицательный отбор может являться особенно полезным, когда недоступно антитело, которое специфически идентифицирует тип клеток в гетерогенной популяции, так что разделение наилучшим образом проводят на основании маркеров, экспрессированных клетками, отличными от желательной популяции.

[0195] В некоторых вариантах осуществления, стадии способа дополнительно включают отрицательный и/или положительный отбор инкубированных клеток, например, с использованием системы или устройства, которые могут осуществлять отбор на основании аффинности. В некоторых вариантах осуществления, выделение проводят посредством обогащения конкретной популяции клеток посредством положительного отбора, или истощения конкретной популяции клеток, посредством отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления, положительный или отрицательный отбор осуществляют посредством инкубации клеток с одним или несколькими антителами или другими связывающими средствами, которые специфически связываются с одним или несколькими поверхностными маркерами, экспрессированными или экспрессированными (маркер⁺) на относительно более высоком уровне (маркер^{высокий}) на положительно или отрицательно отобранных клетках, соответственно.

[0196] Разделение не обязательно должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной популяции клеток или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительный отбор или обогащение клеток конкретного типа, таких

как клетки, экспрессирующие маркер, относится к увеличению количества или процента таких клеток, но не должны приводить к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Подобным образом, отрицательный отбор, удаление или истощение клеток конкретного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к уменьшению количества или процента таких клеток, но не должно приводить к полному удалению всех таких клеток.

[0197] В некоторых примерах, проводят множество циклов стадий разделения, где положительно или отрицательно отобранную фракцию с одной стадии подвергают другой стадии разделения, например, последующему положительному или отрицательному отбору. В некоторых примерах, на одной стадии разделения можно истощать клетки, экспрессирующие множество маркеров, одновременно, например, посредством инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, каждым специфическим для маркера, на который нацеливаются для отрицательного отбора. Подобным образом, множество типов клеток можно одновременно положительно отбирать посредством инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессированных на различных типах клеток.

[0198] Например, в некоторых аспектах, специфические субпопуляции Т-клеток, такие как клетки, положительные для или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺ Т-клетки, выделяют посредством способов положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления, такие клетки отбирают посредством инкубации с одним или несколькими антителами или партнерами по связыванию, которые специфически связываются с такими маркерами. В некоторых вариантах осуществления, антитело или партнера по связыванию можно конъюгировать, например, напрямую или опосредованно, с твердой подложкой или матрицей для осуществления отбора, такой как магнитная бусина или парамагнитные бусина. Например, можно проводить положительный отбор CD3⁺, CD28⁺ Т-клеток с использованием конъюгированных с антителом против CD3/антителом против CD28 магнитных бусин (например, бусин DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander и/или ExpACT®).

[0199] В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки отделяют из образца РВМС посредством отрицательного отбора по маркерам, экспрессированным на клетках, не относящихся к Т-клеткам, таких как В-клетки, моноциты или другие лейкоциты, такие как CD14. В некоторых аспектах, стадию отбора CD4⁺ или CD8⁺ используют для разделения CD4⁺ Т-клеток-помощников и CD8⁺ цитотоксических Т-клеток. Такие популяции CD4⁺ и CD8⁺ можно далее сортировать на субпопуляции посредством положительного или отрицательного отбора по маркерам, экспрессированным или экспрессированным в относительно более высокой степени на одной или нескольких субпопуляциях наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток.

[0200] В некоторых вариантах осуществления, $CD8^+$ клетки дополнительно обогащают или истощают по наивным клеткам, центральным клеткам памяти, эффекторным клеткам памяти и/или центральным стволовым клеткам памяти, например, посредством положительного или отрицательного отбора на основании поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления, обогащение по центральным Т-клеткам памяти (T_{CM}) проводят для увеличения эффективности, например, для улучшения длительной выживаемости, размножения и/или приживления после введения, которые, в некоторых аспектах, являются особенно сильными в таких субпопуляциях. См. Terakura et al., (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В некоторых вариантах осуществления, комбинация обогащенных TCM $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток дополнительно улучшает эффективность.

[0201] В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки памяти присутствуют в обеих $CD62L^+$ и $CD62L^-$ подгруппах $CD8^+$ лимфоцитов периферической крови. РВМС можно обогащать или истощать по $CD62L^-CD8^+$ и/или $CD62L^+CD8^+$ фракциям, например, с использованием антител против $CD8$ и против $CD62L$.

[0202] В некоторых вариантах осуществления, обогащение по центральным Т-клеткам памяти (TCM) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии $CD45RO$, $CD62L$, $CCR7$, $CD28$, $CD3$ и/или $CD127$; в некоторых аспектах, оно основано на отрицательном отборе клеток, экспрессирующих или высоко экспрессирующих $CD45RA$ и/или гранзим В. В некоторых аспектах, выделение $CD8^+$ популяции, обогащенной по клеткам TCM , проводят посредством истощения клеток, экспрессирующих $CD4$, $CD14$, $CD45RA$, и положительного отбора или обогащения клеток, экспрессирующих $CD62L$. В одном аспекте, обогащение по центральным Т-клеткам памяти (TCM) проводят, начиная с отрицательной фракции клеток, отобранной на основании экспрессии $CD4$, которую подвергают отрицательному отбору на основании экспрессии $CD14$ и $CD45RA$, и положительному отбору на основании $CD62L$. Такие отборы, в некоторых аспектах, проводят одновременно, и в других аспектах проводят последовательно, в любом порядке. В некоторых аспектах, такую же стадию отбора на основании экспрессии $CD4$, какая использована для получения популяции или субпопуляции $CD8^+$ клеток, используют также для получения популяции или субпопуляции $CD4^+$ клеток, таким образом, что как положительную, так и отрицательную фракции после разделения на основании $CD4$, сохраняют и используют в последующих стадиях способов, необязательно, после одной или нескольких дополнительных стадий положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления, отбор популяции $CD4^+$ клеток и отбор популяции $CD8^+$ клеток проводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления, отбор популяции $CD4^+$ клеток и отбор популяции $CD8^+$ клеток проводят последовательно, в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления, способы отбора клеток могут включать способы, как описано в опубликованной Патентной заявке США No. US20170037369. В некоторых вариантах

осуществления, отобранную популяцию $CD4^+$ клеток и отобранную популяцию $CD8^+$ клеток можно объединять после отбора. В некоторых аспектах, отобранную популяцию $CD4^+$ клеток и отобранную популяцию $CD8^+$ клеток можно объединять в контейнере, таком как пакет.

[0203] В конкретном примере, образец PBMC или образец других белых кровяных клеток подвергают отбору $CD4^+$ клеток, при котором как отрицательную, так и положительную фракции сохраняют. Отрицательную фракцию затем подвергают отрицательному отбору на основании экспрессии CD14 и CD45RA или CD19, и положительному отбору на основании маркера, характерного для центральных Т-клеток памяти, такого как CD62L или CCR7, где положительный и отрицательный отбор проводят в любом порядке.

[0204] $CD4^+$ Т-клетки-помощники можно сортировать на наивные клетки, центральные клетки памяти и эффекторные клетки посредством идентификации популяций клеток, имеющих антигены клеточной поверхности. $CD4^+$ лимфоциты можно получать посредством стандартных способов. В некоторых вариантах осуществления, наивные $CD4^+$ Т-лимфоциты представляют собой $CD45RO^-$, $CD45RA^+$, $CD62L^+$ или $CD4^+$ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, центральные $CD4^+$ клетки памяти представляют собой $CD62L^+$ и $CD45RO^+$. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные $CD4^+$ клетки представляют собой $CD62L^-$ и $CD45RO^-$.

[0205] В одном примере, для обогащения $CD4^+$ клеток посредством отрицательного отбора, коктейль моноклональных антител, как правило, включает антитела против CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления, антитело или партнер по связыванию связаны с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитная бусина или парамагнитная бусина, для обеспечения разделения клеток для положительного и/или отрицательного отбора. Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки и популяции клеток отделяют или выделяют с использованием иммуномагнитных (или аффинномагнитных) способов разделения (обзор которых приведен 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).

[0206] В некоторых аспектах, инкубируемый образец или композицию клеток, подлежащие разделению, инкубируют с реагентом для отбора, содержащим малый, намагничиваемый или чувствительный к магнитному полю материал, такой как чувствительные к магнитному полю частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные бусины (например, такие как бусины Dynalbeads или MACS®). Чувствительный к магнитному полю материал, например, частица, как правило, напрямую или опосредованно присоединена к партнеру по связыванию, например, антителу, которое специфически связывается с молекулой, например, поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые являются

желательными для разделения, например, которые являются желательными для отрицательного или положительного отбора.

[0207] В некоторых вариантах осуществления, магнитная частица или бусина содержит чувствительный к магнитному полю материал, связанный с участником специфического связывания, таким как антитело или другой партнер по связыванию. Существует множество хорошо известных чувствительных к магнитному полю материалов, используемых в способах магнитного разделения, например, материалы, описанные в Molday, Патент США No. 4452773, и в описании Европейской патентной заявки EP 452342 B, содержание которых, таким образом, приведено в качестве ссылки. Можно использовать также частицы коллоидного размера, такие как частицы, описанные в Owen Патент США No. 4795698, и Liberti et al., Патент США No. 5200084.

[0208] Инкубацию, как правило, проводят в условиях, в которых 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 присоединены к магнитной частице или бусине, специфически связываются с молекулами поверхности клетки, если они присутствуют на клетках в образце.

[0209] В конкретных вариантах осуществления, чувствительные к магнитному полю частицы покрыты первичными антителами или другими партнерами по связыванию, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В конкретных вариантах осуществления, магнитные частицы присоединяют к клеткам посредством покрытия первичными антителами, специфическими для одного или нескольких маркеров. В конкретных вариантах осуществления, клетки, а не бусины, метят первичным антителом или партнером по связыванию, и затем добавляют покрытые специфическим для типа клеток вторичным антителом или другим партнером по связыванию (например, стрептавидином) магнитные частицы. В конкретных вариантах осуществления, покрытые стрептавидином магнитные частицы используют в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

[0210] В некоторых аспектах, разделение осуществляют способом, в котором образец помещают в магнитное поле, и клетки, имеющие присоединенные к ним чувствительные к магнитному полю или намагничиваемые частицы, могут привлекаться к магниту и отделяться от немеченых клеток. Для положительного отбора, клетки, привлекаемые к магниту, сохраняют; для отрицательного отбора, клетки, не привлекаемые (немеченые клетки), сохраняют. В некоторых аспектах, комбинацию положительного и отрицательного отбора осуществляют в ходе одной и той же стадии отбора, где положительные и отрицательные фракции сохраняют и далее перерабатывают или подвергают дальнейшим стадиям разделения.

[0211] В некоторых вариантах осуществления, отбор на основании аффинности проводят посредством магнитной сортировки активированных клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Системы магнитной сортировки активированных клеток (MACS),

например, системы CliniMACS, способны осуществлять с высокой чистотой отбор клеток, имеющих присоединенные к ним намагниченные частицы. В конкретных вариантах осуществления, MACS функционирует в режиме, где нецелевые и целевые молекулы последовательно элюируют после приложения внешнего магнитного поля. То есть, клетки, присоединенные к намагниченным частицам, удерживают на месте, в то время как не присоединенные молекулы элюируют. Затем, по завершению первой стадии элюции, молекулы, захваченные в магнитном поле и защищенные от элюции, высвобождают каким-либо способом, таким образом, что их можно элюировать и выделять. В конкретных вариантах осуществления, нецелевые клетки метят и истощают из гетерогенной популяции клеток.

[0212] В некоторых вариантах осуществления, чувствительные к магнитному полю частицы остаются присоединенными к клеткам, которые подлежат последующим инкубации, культивированию и/или модификации; в некоторых аспектах, частицы остаются присоединенными к клеткам для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления, намагничиваемые или чувствительные к магнитному полю частицы удаляют от клеток. Способы удаления намагничиваемых частиц от клеток известны и включают, например, использование конкурентных немеченых антител, намагничиваемых частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами, и т.д. В некоторых вариантах осуществления, намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

[0213] В некоторых вариантах осуществления, способ изготовления, получения или продукции средства для клеточной терапии включает стадию, на которой CD4⁺ и CD8⁺ клетки выделяют по отдельности и затем смешивают до стадии введения рекомбинантного рецептора, например, CAR, в клетки. В некоторых вариантах осуществления, CD4⁺ и CD8⁺ клетки смешивают в соотношении от 1:5 до 5:1 CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, например, 1:3-3:1, 1:2-2:1, или точно или приблизительно в соотношении 1:1 CD4⁺ и CD8⁺ клеток до введения средства, кодирующего рекомбинантный рецептор, и/или одной или нескольких из последующих стадий переработки для получения генетически модифицированных клеток.

[0214] В некоторых вариантах осуществления, способ изготовления, получения или продукции средства для клеточной терапии включает стадию отдельного выделения CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и отдельного проведения одной или нескольких последующих стадий для отобранных или выделенных CD4⁺ Т-клеток, и отдельного проведения одной или нескольких последующих стадий для отобранных или выделенных CD8⁺ Т-клеток. В аспектах такого варианта осуществления, трансдуцированные клетки, такие как отдельные композиции CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток, генетически модифицированные с использованием рекомбинантного рецептора, например, CAR, можно объединять в форме одной композиции до стадии составления клеток. В других аспектах такого варианта осуществления, трансдуцированные клетки, такие как трансдуцированные клетки, такие как отдельные композиции CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток, генетически

модифицированных с использованием рекомбинантного рецептора, например, CAR, составляют отдельно, например, для отдельного введения субъекту.

В. Активация и стимуляция клеток

[0215] В некоторых вариантах осуществления, способы получения или модификации клеток, таких как клетки, которые оценивают или анализируют представленными способами, включают стадию стимуляции выделенных клеток, таких как отобранные популяции клеток. Инкубацию можно проводить до или в связи с введением полинуклеотида, например, введением полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена для интеграции, например, посредством трансдукции. В некоторых вариантах осуществления, стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток, например, до трансдукции.

[0216] В некоторых вариантах осуществления, получение или модификация включает стадии инкубации клеток, таких как отобранные клетки, в которых стадии инкубации могут включать культивацию, культивирование, стимуляцию, активацию и/или размножение клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего средства. Такие условия включают условия, разработанные для индукции пролиферации, активации, и/или выживаемости клеток в популяции, для имитации воздействия антигена, и/или для примирования клеток для генетической инженерии, например, для введения рекомбинантного рецептора антигена.

[0217] В некоторых вариантах осуществления, условия для стимуляции и/или активации могут включать одно или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, 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, разработанные для активации клеток.

[0218] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия или средства включают одно или несколько средств, например, лиганд, способный стимулировать или активировать внутриклеточный передающий сигналы домен комплекса TCR. В некоторых аспектах, средство запускает или инициирует внутриклеточный каскад передачи сигналов TCR/CD3 в Т-клетке, например, средства, пригодные для подачи первичного сигнала, например, для инициации активации индуцированного ИТАМ сигнала, такие как средства, специфические для компонента TCR, например, антитело против CD3. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают одно или несколько средств, стимулирующих костимулирующий сигнал, такие как средство, специфическое для Т-клеточного костимулирующего рецептора, например, антитело против CD28 или антитело против 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления, такие средства и/или лиганды могут быть связаны с твердой подложкой, такой как бусина, и/или с одним или несколькими цитокинами. Среди

стимулирующих средств присутствуют бусины с антителом против CD3/антителом против CD28 (например, бусины DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander, и/или ExpACT®). Необязательно, способ размножения может дополнительно включать стадию добавления антитела против CD3 и/или против CD28 в культуральную среду (например, в концентрации по меньшей мере приблизительно 0,5 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие средства включают IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых аспектах, концентрация IL-2 составляет 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.

[0219] Условия могут включать одно или несколько из конкретных сред, 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, разработанные для активации клеток.

[0220] В некоторых аспектах, инкубацию проводят в соответствии с такими способами, как описано в Патенте США No. 6040177 от Riddell et al., Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82, и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

[0221] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть инкубации в присутствии одного или нескольких стимулирующих условий или стимулирующих средств проводят во внутренней полости камеры для центрифугирования, например, при вращении центрифуги, например, как описано в WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть инкубации, проводимой в камере для центрифугирования, включает смешивание с реагентом или реагентами для индукции стимуляции и/или активации. В некоторых вариантах осуществления, клетки, такие как отобранные клетки, перемешивают с использованием стимулирующего условия или стимулирующего средства в камере для центрифугирования. В некоторых аспектах таких способов, некоторый объем клеток перемешивают с использованием некоторого количества одного или нескольких стимулирующих условий или средств, которое намного меньше, чем обычно используют при проведении сходных стимуляций в культуральном планшете или другой системе.

[0222] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, значительно меньшем чем (например, составляющем не более чем 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% количества), по сравнению с количеством стимулирующего средства, которое как правило, используют или необходимо использовать для достижения приблизительно такой же или сходной эффективности отбора для такого же количества клеток или такого же объема клеток, когда отбор проводят без перемешивания в камере для центрифугирования, например, в пробирке или пакете с периодическим встряхиванием

или вращением. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят с добавлением буфера для инкубации к клеткам и стимулирующего средства для достижения целевого объема при инкубации реагента, например, от 10 мл до 200 мл, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере, или приблизительно, или 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 150 мл или 200 мл. В некоторых вариантах осуществления, буфер для инкубации и стимулирующее средство предварительно смешивают перед добавлением к клеткам. В некоторых вариантах осуществления, буфер для инкубации и стимулирующее средство по отдельности добавляют к клеткам. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующую инкубацию проводят в условиях периодического осторожного перемешивания, которое может способствовать стимуляции энергетически выгодных взаимодействий и таким образом, позволяет использование меньшего общего количества стимулирующего средства, с достижением в то же время стимуляции и активации клеток.

[0223] В некоторых вариантах осуществления, инкубацию, как правило, проводят в условиях перемешивания, например, в присутствии вращения, как правило, при относительно низких ускорениях или скорости, такой как скорость ниже, чем используют для осаждения клеток, например, от точно или приблизительно 600 об./мин до 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 для образца или стенки камеры или другого контейнера от точно или приблизительно 80 g до 100 g (например, точно или приблизительно, или по меньшей мере 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах осуществления, вращение проводят с использованием повторяющихся интервалов вращения при такой низкой скорости с последующим периодом покоя, например, вращение и/или покой в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, вращение в течение приблизительно 1 или 2 секунд с последующим покоем в течение приблизительно 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0224] В некоторых вариантах осуществления, общая длительность инкубации, например, со стимулирующим средством, составляет между или между приблизительно 1 часом и 96 часами, 1 часом и 72 часами, 1 часом и 48 часами, 4 часами и 36 часами, 8 часами и 30 часами или 12 часами и 24 часами, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов или 72 часа. В некоторых вариантах осуществления, дополнительную инкубацию проводят в течение времени между или приблизительно между 1 часом и 48 часами, 4 часами и 36 часами, 8 часами и 30 часами или 12 часами и 24 часами, включая каждое.

С. Введение полинуклеотида, содержащего последовательности трансгена

[0225] В некоторых вариантах осуществления, представленные способы можно осуществлять для оценки клеток, модифицированных посредством введения полинуклеотидов, кодирующих последовательности трансгена. В некоторых вариантах осуществления, способы получения или модификации клеток, таких как клетки, которые оценивают или анализируют представленными способами, включают стадию введения

полинуклеотида, содержащего последовательности трансгена, кодирующие рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, в модифицированные клетки введен полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, в условиях для интеграции последовательности трансгена в геном клетки. Введение полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, такую как последовательности трансгена, кодирующие рекомбинантный белок, в клетку, можно проводить с использованием любого из множества различных способов доставки. В некоторых аспектах, условие для интеграции последовательности трансгена включает любое условие, описанное в настоящем описании, например, использование системы вирусной трансдукции для интеграции последовательности трансгена в геном клетки, например, иммунocyта.

[0226] В некоторых аспектах, полинуклеотид, содержащий последовательности трансгена, кодирующие рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, могут содержаться в векторе. В некоторых аспектах, такие векторы включают вирусные и невирусные системы, включая лентивирусные и гамма-ретровирусные системы, так же как системы на основе транспозонов, такие как системы переноса генов на основе PiggyBac или Sleeping Beauty. Иллюстративные способы включают способы введения или доставки нуклеиновых кислот в клетку, включая способы посредством вирусной, например, ретровирусной или лентивирусной трансдукции, транспозонов и электропорации.

[0227] В некоторых вариантах осуществления, введение полинуклеотида осуществляют посредством сначала стимуляции клетки, например, посредством ее объединения со стимулом, который индуцирует ответ, такой как пролиферация, выживаемость, и/или активация, например, как измерено по экспрессии цитокина или маркера активации, с последующими трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до количеств, достаточных для клинических применений.

[0228] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид представляет собой линейную или кольцевую молекулу нуклеиновой кислоты, такую как линейная или кольцевая ДНК, или линейная РНК, и может быть доставлен с использованием любого из способов доставки молекулы нуклеиновой кислоты в клетку. В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотид вводят в клетки в форме нуклеотида, например, в форме или в составе невирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления, невирусный вектор представляет собой или включает полинуклеотид, например, полинуклеотид ДНК или РНК, пригодный для трансдукции и/или трансфекции посредством любого пригодного и/или известного невирусного способа для доставки генов, такого как, но без ограничения, микроинъекция, электропорация, временные компрессия или сжатие клеток (такие как описано в Lee, et al. (2012) *Nano Lett* 12: 6322-27), опосредованная липидами трансфекция, доставка, опосредованная пептидами, например, проникающими в клетку пептидами, или их комбинация.

[0229] В некоторых 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 некоторых 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 иммунocyтах включают трансфекцию с использованием фосфата кальция (например, как описано в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York. N.Y.), слияние протопластов, опосредованную катионными липосомами трансфекцию; бомбардировку микрочастицами с использованием частиц вольфрама (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); и копреципитацию фосфата стронция и ДНК (Brash et al., Mol. Клетка Biol., 7: 2031-2034 (1987)).

[0230] Другие способы и векторы для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, представляют собой способы, описанные, например, в Публикации международной патентной заявки No.: WO2014055668 и Патенте США No. 7446190.

[0231] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, Т-клетки, можно трансфицировать либо во время, либо после размножения, например, с использованием препарата вируса, содержащего полинуклеотиды, содержащие последовательности трансгена, кодирующие рекомбинантный белок, такой как Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный рецептор антигена (CAR). Эту трансдукцию для введения полинуклеотида желательного рецептора можно проводить, например, с использованием любого пригодного ретровирусного вектора. Генетически модифицированную популяцию клеток можно затем освобождать от исходного стимула (например, стимула антитела против CD3/антитела против CD28) и затем стимулировать с использованием второго типа стимула например, с использованием нового введенного рецептора). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме пептида/молекулы МНС, родственной (перекрестно связывающий) лиганд для генетически введенного рецептора (например, природный лиганд CAR) или любой лиганд (такой как антитело), который напрямую связывается в пределах каркаса нового рецептора (например, посредством узнавания константных областей в рецепторе). См., например, Cheadle et al, «Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy» Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66 или Barrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014).

[0232] В некоторых случаях, можно использовать вектор, не требующий, чтобы клетки, например, Т-клетки, являлись активированными. В некоторых таких случаях, клетки можно отбирать и/или трансдуцировать до активации. Таким образом, клетки можно модифицировать до или после культивирования клеток, и, в некоторых случаях, во время или в ходе по меньшей мере части культивирования.

[0233] В некоторых аспектах, клетки дополнительно модифицируют для стимуляции экспрессии цитокинов или других факторов. Среди дополнительных нуклеиновых кислот, например, генов для введения, включены нуклеиновые кислоты, которые могут улучшать эффективность терапии, например, посредством стимуляции жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; гены для предоставления генетического маркера для отбора и/или оценки клеток, например, для оценки выживаемости или локализации *in vivo*; гены для улучшения безопасности, например, посредством придания клетке чувствительности 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); см. также WO 1992/008796 и WO 1994/028143, описывающие использование бифункциональных поддающихся отбору слитых генов, полученных в результате слияния доминантного положительного селективного маркера с отрицательным селективным маркером. См., например, Riddell et al., Патент США No. 6040177, в колонках 14-17.

[0234] В некоторых вариантах осуществления, введение проводят посредством приведения одной или нескольких клеток из композиции в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, приведение в контакт можно осуществлять с использованием центрифугирования, такого как спинокуляция (например, центрифужная инокуляция). Такие способы включают любые из способов, как описано в WO2016/073602. Иллюстративные камеры для центрифугирования включают камеры, производимые и продаваемые в Biosafe SA, включая камеры для использования с системой Seraх® и Seraх® 2, включая камеры для центрифугирования A-200/F и A-200, и различные наборы для использования с такими системами. Иллюстративные камеры, системы, и оборудование и шкафы для переработки описаны, например, в Патенте США No. 6123655, Патенте США No. 6733433 и US 2008/0171951, и WO 00/38762, полное содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Иллюстративные наборы для использования с такими системами включают, но без ограничения, одноразовые наборы, продаваемые BioSafe SA под наименованиями продуктов CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 или CS-900.2.

[0235] В некоторых вариантах осуществления, в систему включают и/или систему помещают во взаимодействие с другим оборудованием, включая оборудование для выполнения, автоматизации, контроля и/или мониторингирования аспектов стадии трансдукции и одной или нескольких различных других стадий переработки, осуществляемых в системе, например, одной или нескольких стадий переработки, которые можно проводить с или в сочетании с системой камеры для центрифугирования, как описано в настоящем описании или в WO2016/073602. Это оборудование, в некоторых вариантах осуществления, содержат внутри шкафа. В некоторых вариантах осуществления, оборудование включает шкаф, включающий корпус, содержащий контрольные схемы, центрифугу, крышку, моторы, насосы, сенсоры, дисплеи и

пользовательский интерфейс. Иллюстративные устройства описаны в Патенте США No. 6123655, Патенте США No. 6733433 и US 2008/0171951.

[0236] В некоторых вариантах осуществления, система содержит серии контейнеров, например, пакетов, трубок, дозаторов, зажимов, коннекторов и камеру для центрифугирования. В некоторых вариантах осуществления, контейнеры, такие как пакеты, включают один или несколько контейнеров, таких как пакеты, содержащие клетки, подлежащие трансдукции, и частицы вирусного вектора, в одном и том же контейнере или в отдельных контейнерах, таких как один и тот же пакет или отдельные пакеты. В некоторых вариантах осуществления, система дополнительно включает один или несколько контейнеров, таких как пакеты, содержащие среду, такую как разбавитель и/или раствор для промывки, которые вводят в камеру, и/или другие компоненты для разведения, ресуспендирования и/или промывки компонентов и/или композиций в ходе способов. Контейнеры можно присоединять в одном или нескольких положениях в системе, например, в положении, соответствующем линии входа, линии разведения, линии промывки, линии отходов и/или линии выхода.

[0237] В некоторых вариантах осуществления, камера ассоциирована с центрифугой, способной осуществлять вращение камеры, например, вокруг ее оси вращения. Вращение может происходить до, во время и/или после инкубации в сочетании с трансдукцией клеток, и/или на одной или нескольких из других стадий переработки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, одну или несколько из различных стадий переработки проводят при вращении, например, с определенным ускорением. Камера, как правило, является способной к вертикальному или в основном вертикальному вращению, таким образом, что камера находится вертикально во время центрифугирования, и боковая стенка и ось являются вертикальными или в основном вертикальными, где торцевая стенка(стенки) являются горизонтальными или в основном горизонтальными.

[0238] В некоторых вариантах осуществления, композицию, содержащую клетки, вирусные частицы и реагент, можно подвергать вращению, как правило, при относительно низких ускорении или скорости, такой как скорость ниже, чем используют для осаждения клеток, например, от точно или приблизительно 600 об./мин до 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 некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляют при ускорении, например, относительном центробежном ускорении, от точно или приблизительно 100 g до 3200 g (например, точно или приблизительно, или по меньшей мере точно 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 измерено, например, у внутренней или внешней стенки 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 точке в камере или другом контейнере, подвергаемом вращению), относительно гравитационной силы Земли, в конкретной точке

пространства, по сравнению с осью вращения. Это значение можно определять с использованием хорошо известных формул, принимая во внимание гравитационную силу, скорость вращения и радиус вращения (расстояние от оси вращения и объекта, вещества или частицы, для которых измеряют RCF).

D. Нуклеиновые кислоты и векторы

[0239] В некоторых вариантах осуществления, клетки, оцениваемые или анализируемые с использованием представленных способов, включают иммунциты, которые были подвергнуты генетической инженерии. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, Т-клетки, подвергают генетической инженерии для экспрессии рекомбинантного белка, такого как рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, модификацию проводят посредством введения одного или нескольких полинуклеотида(полинуклеотидов), которые содержат последовательности трансгена, кодирующие рекомбинантные белки или их части или компоненты. В некоторых аспектах, часть полинуклеотида, например, содержащую последовательности трансгена, вводят для интеграции последовательности в геном клетки, например, клетки, подвергаемой модификации. I В некоторых аспектах, полинуклеотид содержится в векторе, таком как вирусный вектор, для введения полинуклеотида в модифицированную клетку.

[0240] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий последовательности трансгена, может содержаться в векторной молекуле. В некоторых вариантах осуществления, вирус представляет собой ДНК-вирус (например, дцДНК- или оцДНК-вирус). В некоторых вариантах осуществления, вирус представляет собой РНК-вирус (например, оцРНК-вирус). Иллюстративные вирусные векторы/вирусы включают, например, ретровирусы, лентивирусы, аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), вирусы осповакцины, поксвирусы и вирусы простого герпеса, или любой из вирусов, описанных в другом месте в настоящем описании. Полинуклеотид можно вводить в клетку как часть молекулы вектора, имеющей дополнительные последовательности например, такие как точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотику. Кроме того, полинуклеотиды можно вводить в форме голой нуклеиновой кислоты, в форме нуклеиновой кислоты в комплексе с такими материалами, как липосома, наночастица или полксамер, или можно доставлять посредством вирусов (например, аденовируса, AAV, вируса герпеса, ретровируса, лентивируса и дефектного по интегразе лентивируса (IDLV)).

[0241] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий последовательности трансгена, например, последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, переносят в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, например, таких как векторы, происходящие из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусы, аденоассоциированный вирус (AAV) и вирус иммунодефицита человека (HIV). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки с использованием

рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 November 29(11): 550-557 или происходящие из HIV-1 лентивирусные векторы.

[0242] В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор имеет последовательность длинного концевой повтора (LTR), например, из ретровирусного вектора, происходящую из вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мыши (MESV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV), вируса, образующего очаги в селезенке (SFFV), или вируса иммунодефицита человека (HIV). В некоторых вариантах осуществления, ретровирусы включают ретровирусы, происходящие из любого источника среди клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы, как правило, являются амфотропными, что означает, что они являются способными инфицировать клетки-хозяева из нескольких видов, включая человека. В некоторых вариантах осуществления, геном, подлежащим экспрессии, заменяют ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (например, Патенты США No. 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.

[0243] 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.

[0244] В других аспектах, полинуклеотид доставляют посредством вирусных и/или невирусных способов переноса генов. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид доставляют в клетки посредством аденоассоциированного вируса (AAV). Можно использовать любой вектор AAV, включая, но без ограничения, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 и их комбинации. В некоторых случаях, AAV содержит LTR, происходящие из гетерологичного серотипа, по сравнению с серотипом капсида (например, ITR AAV2 с капсидами AAV5, AAV6 или AAV8). В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий средство(средства), и/или полинуклеотид доставляют посредством рекомбинантного AAV. В некоторых вариантах осуществления, AAV может встраивать свой геном в геном клетки-хозяина, например, клетки-мишени, как описано в настоящем описании. В другом варианте осуществления, AAV представляет собой самокомплементарный аденоассоциированный вирус (scAAV), например, scAAV, в котором упакованы обе цепи, которые гибридизованы вместе с формированием двухцепочечной ДНК. Серотипы AAV, которые можно использовать в описанных способах, включают AAV1, AAV2, модифицированный AAV2 (например,

модификации в Y444F, Y500F, Y730F и/или S662V), AAV3, модифицированный AAV3 (например, модификации в Y705F, Y731F и/или T492V), AAV4, AAV5, AAV6, модифицированный AAV6 (например, модификации в S663V и/или T492V), AAV7, AAV8, AAV 8.2, AAV9, AAV.rh10, модифицированный AAV.rh10, AAV.rh32/33, модифицированный AAV.rh32/33, AAV.rh43, модифицированный AAV.rh43, AAV.rh64R1, модифицированный AAV.rh64R1, и псевдотипированный AAV, такой как AAV2/8, AAV2/5 и AAV2/6, также можно использовать в описанных способах.

[0245] В некоторых вариантах осуществления, последовательность трансгена содержится в векторе или может быть клонирована в один или несколько вектор(ов). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько вектор(ов) можно использовать для трансформации или трансфекции клетки-хозяина, например, клетки для модификации. Иллюстративные векторы включают векторы, разработанные для введения, размножения и распространения или для экспрессии, или для того и другого, такие как плазмиды и вирусные векторы. В некоторых аспектах, вектор представляет собой экспрессирующий вектор, например, рекомбинантный экспрессирующий вектор. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные экспрессирующие векторы можно получать с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК.

[0246] В некоторых вариантах осуществления, вектор может представлять собой вектор из серий pUC (Fermentas Life Sciences), серий pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), серий pET (Novagen, Madison, Wis.), серий pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) или серий pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). В некоторых случаях, бактериофаговые векторы, такие как λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 и λ NM1149, также можно использовать. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать экспрессирующие векторы для растений, и они включают pBI01, pBI01.2, pBI01.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В некоторых вариантах осуществления, экспрессирующие векторы для животных включают pEUK-CI, pMAM и pMAMneo (Clontech).

[0247] В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, последовательность трансгена и/или дополнительные полипептид(ы) вводят в клетку 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* 18:1748-1757; и Hackett et al. (2010) *Molecular Therapy* 18:674-683).

[0248] В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько последовательностей трансгена(трансгенов) или вектора(векторов), кодирующих рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор и/или дополнительные полипептид(ы), можно вводить в клетки, например, Т-клетки, либо до, либо после размножения. Это введение последовательности трансгена(трансгенов) или вектора(векторов) можно проводить с использованием, например, любого пригодного

ретровирусного вектора. Полученные генетически модифицированные клетки можно затем освобождать от исходного стимула (например, стимула антитела против CD3/антитела против CD28) и затем стимулировать с использованием второго типа стимула, например, с использованием нового введенного рекомбинантного белка, например, рекомбинантного рецептора). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме пептида/молекулы МНС, родственный (перекрестно сшивающий) лиганд для генетически введенного рецептора (например, природный антиген и/или лиганд CAR), или любой лиганд (такой как антитело), который напрямую связывается в пределах каркаса нового рецептора (например, посредством узнавания константных областей в рецепторе). См., например, Cheadle et al, «Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy» *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66 или Barrett et al., *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine* Vol. 65: 333-347 (2014).

[0249] В некоторых случаях, можно использовать вектор, не требующий, чтобы клетки, например, Т-клетки, являлись активированными. В некоторых таких случаях, клетки можно отбирать и/или трансдуцировать до активации или стимуляции. Таким образом, клетки можно модифицировать до или после культивирования клеток, и, в некоторых случаях, во время или в ходе по меньшей мере части культивирования.

1. Подготовка частиц вирусного вектора для трансдукции

[0250] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий последовательности трансгена, такие как последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, переносят в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц. В некоторых аспектах, полинуклеотид вводят посредством вирусной трансдукции. В некоторых аспектах, последовательности трансгена содержатся в вирусном векторе. Геном вирусного вектора, как правило, конструируют в форме плазмиды, которую можно трансфицировать в упаковывающую или продуцирующую линию клеток. В любом из таких примеров, последовательности трансгена, кодирующие рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, вставлены или локализованы в области вирусного вектора, например, как правило, в не являющейся необходимой области вирусного генома. В некоторых вариантах осуществления, последовательности трансгена вставлены в вирусный геном вместо определенных вирусных последовательностей для получения вируса, который является дефектным по репликации.

[0251] Любой из множества известных способов можно использовать для получения ретровирусных частиц, геном которых содержит РНК-копию генома вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере два компонента вовлечены в получение системы доставки гена на основе вируса: первый, упаковывающие плазмиды, включающие структурные белки, так же как ферменты, необходимые для получения частицы вирусного вектора, и второй, собственно вирусный вектор, т.е.,

генетический материал, подлежащий переносу. Средства для обеспечения биологической безопасности можно вводить в дизайн одного или обоих из этих компонентов.

[0252] В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая плаزمид может содержать все белки ретровируса, такого как HIV-1, отличные от белков оболочки (Naldini et al., 1998). В других вариантах осуществления, вирусные векторы могут быть лишены дополнительных вирусных генов, таких как гены, ассоциированные с вирулентностью, например, *vpr*, *vif*, *vpr* и *nef*, и/или *Tat*, первичный трансактиватор HIV. В некоторых вариантах осуществления, лентивирусные векторы, такие как лентивирусные векторы на основе HIV, содержат только три гена исходного вируса: *gag*, *pol* и *rev*, что уменьшает или исключает возможность реконструкции вируса дикого типа посредством рекомбинации.

[0253] В некоторых вариантах осуществления, геном вирусного вектора вводят в упаковывающую линию клеток, содержащую все компоненты, необходимые для упаковки вирусной геномной РНК, транскрибированной с генома вирусного вектора, в вирусные частицы. Альтернативно, геном вирусного вектора может содержать один или несколько генов, кодирующих вирусные компоненты, в дополнение к одной или нескольким последовательностям трансгена, например, кодирующим представляющий интерес рекомбинантный белок. В некоторых аспектах, однако, чтобы предотвращать репликацию генома в клетке-мишени, эндогенные вирусные гены, необходимые для репликации, удаляют и предоставляют отдельно в упаковывающей линии клеток.

[0254] В некоторых вариантах осуществления, упаковывающую линию клеток трансфицируют одним или несколькими плазмидными векторами, содержащими компоненты, необходимые для получения частиц. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающую линию клеток трансфицируют плазмидой, содержащей геном вирусного вектора, включая LTR, цис-действующую упаковывающую последовательность и представляющую интерес последовательность, т.е., нуклеиновую кислоту, кодирующую рецептор антигена, такой как CAR; и одной или несколькими плазмидами, кодирующими ферментные и/или структурные компоненты вируса, такие как *Gag*, *pol* и/или *rev*. В некоторых вариантах осуществления, множество векторов используют для разделения различных генетических компонентов, образующих частицы ретровирусного вектора. В некоторых таких вариантах осуществления, предоставление отдельных векторов упаковывающей клетке уменьшает шанс событий рекомбинации, которые могут в ином случае приводить к образованию компетентных по репликации вирусов. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать один плазмидный вектор, имеющий все ретровирусные компоненты.

[0255] В некоторых вариантах осуществления, частица ретровирусного вектора, такая как частица лентивирусного вектора, является псевдотипированной для увеличения эффективности трансдукции клеток-хозяев. Например, частица ретровирусного вектора, такая как частица лентивирусного вектора, в некоторых вариантах осуществления, является псевдотипированной с использованием гликопротеина VSV-G, что обеспечивает широкий диапазон клеток-хозяев, расширяющий типы клеток, которые можно

трансдуцировать. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающую линию клеток трансфицируют плазмидой или полинуклеотидом, кодирующими неприродный гликопротеин оболочки, таким образом, чтобы включать ксенотропные, политропные или амфотропные оболочки, такие как оболочка вируса Синдбис, GALV или VSV-G.

[0256] В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая линия клеток предоставляет компоненты, включая вирусные регуляторные и структурные белки, которые необходимы в транс- для упаковки вирусной геномной РНК в частицы лентивирусных векторов. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая линия клеток может представлять собой любую линию клеток, которая является способной к экспрессии лентивирусных белков и к продукции функциональных частиц лентивирусных векторов. В некоторых аспектах, пригодные упаковывающие 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).

[0257] В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая линия клеток стабильно экспрессирует вирусный белок(белки). Например, в некоторых аспектах, можно конструировать упаковывающую линию клеток, содержащую gag, pol, rev и/или другие структурные гены, но без LTR и упаковывающих компонентов. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающую линию клеток можно временно трансфицировать молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими один или несколько вирусных белков, вместе с геномом вирусного вектора, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок, и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей гликопротеин оболочки.

[0258] В некоторых вариантах осуществления, вирусные векторы и упаковывающие плазмиды, и/или плазмиды-помощники вводят посредством трансфекции или инфекции в упаковывающую линию клеток. Упаковывающая линия клеток продуцирует частицы вирусного вектора, содержащие геном вирусного вектора. Способы трансфекции или инфекции хорошо известны. Неограничивающие примеры включают способы с использованием фосфата кальция, DEAE-декстрана и липофекции, электропорации и микроинъекции.

[0259] Когда рекомбинантную плазмиду и ретровирусный LTR, и упаковывающие последовательности вводят в специальную линию клеток (например, посредством преципитации, например, фосфатом кальция), упаковывающие последовательности могут позволять упаковку РНК-транскрипта из рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем могут быть секретированы в культуральную среду. Затем среды, содержащие рекомбинантные ретровирусы, в некоторых вариантах осуществления, собирают, необязательно, концентрируют и используют для переноса генов. Например, в некоторых аспектах, после совместной трансфекции упаковывающих плазмид и вектора для переноса в упаковывающую линию клеток, частицы вирусного вектора выделяют из культуральных сред и титруют стандартными способами, используемыми специалистом в данной области.

[0260] В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, можно продуцировать в упаковывающей линии клеток, такой как иллюстративная линия клеток НЕК 293Т, посредством введения плазмид, чтобы позволить образование лентивирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая клетка трансфицирована полинуклеотидом и/или содержит полинуклеотид, кодирующий gag и pol, и полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, такой рецептор антигена, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая линия клеток, необязательно и/или дополнительно, трансфицирована полинуклеотидом и/или содержит полинуклеотид, кодирующий белок rev. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая линия клеток, необязательно и/или дополнительно, трансфицирована полинуклеотидом и/или содержит полинуклеотид, кодирующий неприродный гликопротеин оболочки, такой как VSV-G. В некоторых таких вариантах осуществления, приблизительно через двое суток после трансфекции клеток, например, клеток НЕК 293Т, супернатант клеток содержит рекомбинантные лентивирусные векторы, которые можно выделять и титровать.

[0261] Выделенные и/или продуцированные частицы ретровирусного вектора можно использовать для трансдукции клеток-мишеней с использованием способов, как описано. При попадании в клетки-мишени, 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, рецептора антигена, такого как CAR.

Е. Культивирование и/или размножение клеток

[0262] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, модифицированные клетки, оцениваемые или анализируемые с использованием представленных способов, получают с использованием способа модификации или получения, который не включает стадию культивирования и/или размножения клеток после введения полинуклеотида, или способа получения или модификации, который является укороченным или ускоренным, например, с использованием способа получения без размножения. В некоторых аспектах, укороченный или ускоренный способ получения включает укороченную или ускоренную стадию размножения, или не включает стадию размножения, после введения нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, после введения полинуклеотида, содержащего последовательности трансгена, в клетку, клетки подвергают укороченной или ускоренной стадии инкубации для размножения или не подвергают стадии размножения, например, подвергают способу получения без размножения. В некоторых аспектах, представленные способы осуществляют в одной или нескольких временных точках в ходе не включающего размножения, укороченного или ускоренного способа получения.

[0263] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, модифицированные клетки, оцениваемые или анализируемые с использованием представленных способов, получают с использованием способа модификации или

получения, который может включать одну или несколько стадий культивирования модифицированных клеток, например, культивирования клеток в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы включают одну или несколько стадий культивирования модифицированных клеток, например, культивирования клеток в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления, в ходе по меньшей мере части способа введения полинуклеотида, например, посредством вирусной трансдукции, и/или после введения полинуклеотида, клетки культивируют, например, для культивирования или размножения клеток. В некоторых аспектах, представленные способы можно осуществлять в один или несколько периодов времени после введения полинуклеотида, например, посредством вирусной трансдукции, например, в одной или нескольких временных точках в ходе культивирования или размножения клеток.

[0264] В некоторых аспектах, после введения полинуклеотида, содержащего последовательности трансгена в клетку, клетки затем переносят в контейнер, такой как пакет для культивирования. В некоторых вариантах осуществления, контейнер для культивирования или размножения клеток представляет собой пакет для биореактора, такой как пакет для перфузии. В некоторых вариантах осуществления, клетки, культивируемые во время того, когда они заключены в биореактор, соединены с биореактором и/или находятся под контролем биореактора, подвергаются размножению в ходе культивирования более быстро, чем клетки, культивируемые без биореактора, например, клетки, культивируемые в статических условиях, например, без перемешивания, вращения, движения и/или перфузии.

[0265] В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки культивируют в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение, после стадии генетической инженерии, например, введения рекомбинантного полипептида для клеток посредством трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления, клетки культивируют после того, как клетки инкубированы в стимулирующих условиях и трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом, например, полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, при культивировании получают одну или несколько культивированных композиций обогащенных Т-клеток.

[0266] В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки культивируют в контейнере, который можно заполнять, например, через загрузочное отверстие, средами для клеток и/или клетками для культивирования добавленных клеток. Клетки могут происходить из любого источника клеток, для которых культивирование клеток является желательным, например, для размножения и/или пролиферации клеток.

[0267] В некоторых аспектах, культуральная среда представляет собой адаптированную культуральную среду, поддерживающую рост, культивирование, размножение или пролиферацию клеток, таких как Т-клетки. В некоторых аспектах, среда

может представлять собой жидкость, содержащую смесь солей, аминокислот, витаминов, сахаров или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, культуральная среда дополнительно включает одно или несколько стимулирующих условий или средств, например, для стимуляции культивирования, размножения или пролиферации клеток в ходе культивирования. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее условие представляет собой или включает один или несколько цитокинов, выбранных из IL-2, IL-7 или IL-15. В некоторых вариантах осуществления, цитокин представляет собой рекомбинантный цитокин. В некоторых вариантах осуществления, концентрация одного или нескольких цитокинов в культуральной среде во время культивирования или инкубации, независимо составляет от точно или приблизительно 1 ед./мл до 1500 ед./мл, например, от точно или приблизительно 1 ед./мл до 100 ед./мл, 2 ед./мл до 50 ед./мл, 5 ед./мл до 10 ед./мл, 10 ед./мл до 500 ед./мл, 50 ед./мл до 250 ед./мл или 100 ед./мл до 200 ед./мл, 50 ед./мл до 1500 ед./мл, 100 ед./мл до 1000 ед./мл или 200 ед./мл до 600 ед./мл. В некоторых вариантах осуществления, концентрация одного или нескольких цитокинов, независимо, составляет по меньшей мере точно или приблизительно 1 ед./мл, 5 ед./мл, 10 ед./мл, 50 ед./мл, 100 ед./мл, 200 ед./мл, 500 ед./мл, 1000 ед./мл или 1500 ед./мл.

[0268] В некоторых аспектах, клетки культивируют, например, инкубируют, в течение по меньшей мере части времени после переноса модифицированных клеток и культуральной среды. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия, как правило, включают температуру, пригодную для роста первичных иммунцитов, таких как Т-лимфоциты человека, например, по меньшей мере приблизительно 25 градусов Цельсия ($^{\circ}\text{C}$), как правило, по меньшей мере приблизительно 30°C , и, как правило, точно или приблизительно 37°C . В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют при температуре от 25 до 38°C , например, при $30-37^{\circ}\text{C}$, например, точно или приблизительно $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение периода времени, пока культивирование, например, культивация или размножение, не приведет к желательным или пороговым плотности, количеству или дозе клеток. В некоторых вариантах осуществления, инкубация составляет более чем или более чем приблизительно, или составляет приблизительно, или составляет 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 5 суток, 6 суток, 7 суток, 8 суток, 9 суток или более.

[0269] В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в условиях для поддержания целевого количества диоксида углерода в культуре клеток. В некоторых аспектах, это обеспечивает оптимальное культивирование, размножение и пролиферацию клеток в ходе роста. В некоторых аспектах, количество диоксида углерода (CO_2) составляет между 10% и 0% (об./об.) указанного газа, например, между 8% и 2% (об./об.) указанного газа, например, количество, равное или приблизительно равное 5% (об./об.) CO_2 .

[0270] В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют с использованием контейнеров, например, пакетов, которые используют в сочетании с биореактором. В некоторых случаях, биореактор можно подвергать движению или

качанию, что, в некоторых аспектах, может увеличивать перенос кислорода. Движение биореактора может включать, но без ограничения, вращение относительно горизонтальной оси, вращение относительно вертикальной оси, качательное движение относительно наклонной или расположенной под углом горизонтальной оси биореактора, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть инкубации проводят с качанием. Скорость качания и угол качания можно корректировать для достижения желательного встряхивания. В некоторых вариантах осуществления, угол качания составляет точно или приблизительно 20°, 19°, 18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2° или 1°. В конкретных вариантах осуществления, угол качания составляет между 6-16°. В других вариантах осуществления, угол качания составляет между 7-16°. В других вариантах осуществления, угол качания составляет между 8-12°. В некоторых вариантах осуществления, скорость качания составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 об./мин. В некоторых вариантах осуществления, скорость качания составляет между 4 и 12 об./мин, например, между 4 и 6 об./мин, включительно. По меньшей мере часть размножения культуры клеток проводят с качательным движением, например, с углом между 5° и 10°, например, 6°, при постоянной скорости качания, такой как скорость между 5 и 15 об./мин, например, 6 об./мин или 10 об./мин. Каждые из CD4+ и CD8+ клеток отдельно размножают, пока каждые из них не достигнут порогового количества или плотности клеток.

[0271] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть инкубации проводят в статических условиях. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть инкубации проводят с перфузией, чтобы выводить посредством перфузии использованную среду и вводить посредством перфузии свежую среду в ходе культивирования. В некоторых вариантах осуществления, способ включает стадию перфузии свежей культуральной среды в культуру клеток, например, через загрузочное отверстие. В некоторых вариантах осуществления, культуральная среда, добавленная в ходе перфузии, содержит одно или несколько стимулирующих средств, например, один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых вариантах осуществления, культуральная среда, добавленная в ходе перфузии, представляет собой такую же культуральную среду, используемую в ходе статической инкубации.

[0272] В некоторых вариантах осуществления, после инкубации, контейнер, например, пакет, повторно присоединяют к системе для проведения одной или нескольких других стадий переработки для изготовления, образования или получения средства для клеточной терапии, например, повторно присоединяют к системе, содержащей камеру для центрифугирования. В некоторых аспектах, культивированные клетки переносят из пакета во внутреннюю полость камеры для получения состава культивированных клеток.

[0273] В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение периода времени, пока культивация, например, культивирование или размножение, не

приведет к желательным или пороговым плотности, количеству или дозе клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки, культивируемые во время того, когда они заключены в биореактор, соединены с биореактором и/или находятся под контролем биореактора, доходят до или достигают пороговых размножения, количества клеток и/или плотности в пределах 21 суток, 14 суток, 10 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 некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение более чем или более чем приблизительно, или в течение приблизительно, или в течение 12 часов, 24 часов, 48 часов, 72 часов, 96 часов, 5 суток, 6 суток, 7 суток, 8 суток, 9 суток или более. В некоторых аспектах, инкубация является укороченной или ускоренной, например, в течение менее чем или менее чем приблизительно, или в течение приблизительно, или в течение 12 часов, 24 часов, 48 часов, 72 часов или 96 часов, после введения нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах, инкубация является достаточной, чтобы позволять доставку и интеграцию последовательности трансгена в геном клеток.

[0274] В некоторых вариантах осуществления, клетки культивируют в течение укороченного или ускоренного времени или подвергают способу получения без размножения. В некоторых аспектах, клетки культивируют в течение менее чем или менее чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 суток после введения нуклеиновых кислот, например, посредством трансдукции или электропорации. В некоторых вариантах осуществления, клетки культивируют в течение приблизительно 2-3 суток, 3-4 суток, 4-5 суток, 5-6 суток или 6-7 суток, или менее, включая каждое.

[0275] В некоторых аспектах, способы можно использовать для определения подходящей длительности инкубации клетки после введения полинуклеотидов, содержащих последовательности трансгена, при которой по большей части или по существу вся интеграция завершена. В некоторых аспектах, способы позволяют определение подходящей длительности инкубации, которая может максимизировать интеграцию, но еще уменьшает истощение модифицированных клеток. В некоторых аспектах, клетка или популяция, или множество клеток не инкубированы при температуре более чем 25°C в течение более чем 48, 54, 60, 66 или 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, в клетку. В некоторых аспектах, клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C в течение более чем 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, в клетку. В некоторых аспектах, клетка не инкубирована при температуре более чем приблизительно 30°C и менее чем приблизительно 40°C в течение более чем 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, в клетку.

Г. Иллюстративные клетки для оценки

[0276] В некоторых аспектах, представленные способы можно осуществлять или проводить для множества клеток или отдельной выделенной клетки, подвергнутых некоторым или всем из стадий способа модификации клеток, включая способ получения с размножением или без размножения. В некоторых вариантах осуществления,

представленные способы осуществляют на протяжении одной или нескольких временных точек, например, во время или после одной или нескольких временных точек способа модификации клеток. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы осуществляют после завершения способа модификации клеток или получения клеток, включая способы модификации или получения, которые включают стадию размножения, или которые не включают стадию размножения, или представляют собой укороченный или ускоренный способ. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы можно осуществлять в образце от субъекта, которого подвергали клеточной терапии. В некоторых аспектах, образец может включать образец крови или сыворотки, или органа, или ткани (например, из пораженного заболеванием участка, такой как образец опухоли) субъекта, полученный после проведения клеточной терапии.

[0277] В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые модифицируют и оценивают, в соответствии с представленными способами, представляют собой первичные клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой иммунциты или обогащенные иммунциты. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой Т-клетки или являются обогащенными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой CD4+ Т-клетки или обогащенные CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой CD8+ Т-клетки или обогащенные CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетки содержат генетически модифицированные клетки или обогащенную популяцию генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки содержат клетки, подлежащие генетической модификации или подвергаемые генетической модификации, или генетически модифицированные, такие как клетки на одной или нескольких ступенях или стадиях способа получения или модификации. В некоторых вариантах осуществления, клетки содержат обогащенную популяцию клеток, подлежащих генетической модификации или подвергаемых генетической модификации. В некоторых вариантах осуществления, клетки содержат генетически модифицированные Т-клетки или обогащенную популяцию генетически модифицированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки являются модифицированными для экспрессии рекомбинантного белка, такого как рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления, клетки предварительно были криоконсервированы. В некоторых вариантах осуществления, клетки предварительно не были криоконсервированы. В некоторых вариантах осуществления, способы можно осуществлять для клеток до криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления, способы можно осуществлять для клеток до введения клеток или композиции клеток субъекту. В некоторых вариантах осуществления, клетки специфически нацелены на клетку опухоли.

[0278] В некоторых вариантах осуществления, клетки культивируют в течение укороченного или ускоренного времени, или подвергают способу получения без

размножения. В некоторых аспектах, клетки культивируют в течение менее чем или менее чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 суток после введения нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный белок, например, посредством трансдукции или электропорации. В некоторых вариантах осуществления, клетки культивируют в течение приблизительно 2-3 суток, 3-4 суток, 4-5 суток, 5-6 суток или 6-7 суток или менее, включая каждое. В некоторых аспектах, клетки которые оценивают в одной или нескольких временных точках, выбранных из суток 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 после введения нуклеиновых кислот, например, посредством трансдукции или электропорации.

[0279] В некоторых аспектах, представленные способы можно осуществлять в один или несколько периодов времени после введения полинуклеотида, но без размножения, например, модифицированная клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно 37°C±2°C, в течение более чем 96, 72 или 48 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена.

[0280] В конкретных вариантах осуществления, одну или несколько оценок, таких как оценка интегрированных и/или неинтегрированных последовательностей трансгена в соответствии со способами, представленными в настоящем описании, осуществляют до того, как модифицированные клетки выпущены для инфузии, готовы для введения субъекту, и/или введены субъекту, например, для клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления, модифицированные клетки выпущены для инфузии, готовы для введения субъекту, и/или введены субъекту после того как одна или несколько оценок проведены, например, для части, фракции и/или образца модифицированных клеток. В конкретных вариантах осуществления, модифицированные клетки выпущены для инфузии, готовы для введения субъекту, и/или введены субъекту после того как определено, что модифицированные клетки являются безопасными, например, стерильными и/или свободными, и/или имеют желательные биологические характеристики после завершения одной или нескольких оценок.

[0281] В некоторых аспектах, полинуклеотид, содержащий последовательности трансгена, вводят в клетку с использованием различных способов доставки, таких как вирусная трансдукция. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки, такие как модифицированные клетки для адоптивной клеточной терапии, необходимо мониторировать или оценивать по различным характеристикам и свойствам, таким как определение уровня экспрессии рекомбинантного белка, кодированного последовательностями трансгена, и/или определение количества копий последовательностей трансгена, интегрированных в геном клетки, например, стабильно интегрированных в геном клетки. В некоторых аспектах, такую оценку можно проводить в одной или нескольких временных точках в ходе способа модификации или получения.

III. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ТРАНСГЕНА

[0282] В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления используют в связи с оценкой интеграции последовательностей трансгена. В некоторых аспектах, полинуклеотиды, введенные в клетки для модификации, например, с

использованием любого из способов для введения полинуклеотидной последовательности, описанной в разделе II выше, содержат последовательности трансгена, подлежащие интеграции в геном клетки. В некоторых аспектах, трансгенную часть последовательности полинуклеотида конструируют для интеграции в геном клетки. В некоторых случаях, последовательность трансгена может относиться к части полинуклеотида, интегрированной в геном клетки.

[0283] В некоторых аспектах, последовательности трансгена (также называемые химерные последовательности, химерная ДНК или рекомбинантная ДНК) включают последовательности нуклеиновой кислоты, полученные искусственно посредством комбинирования составляющих из различных источников, таких как различные организмы, различные гены или различные варианты. В некоторых аспектах, последовательности трансгена подвергают молекулярно-биологической манипуляции, например, посредством искусственного комбинирования различных молекул нуклеиновой кислоты или фрагментов из различных источников. В некоторых вариантах осуществления, последовательности трансгена содержат по меньшей мере некоторую часть последовательностей, происходящих из другого источника, по сравнению с геномной последовательностью клеток, в которые вводят полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена. Например, по меньшей мере часть последовательности трансгена является гетерологичной, экзогенной или трансгенной для клетки, которая, в некоторых случаях, представляет собой первичную клетку, выделенную от субъекта, который является кандидатом для введения модифицированных клеток.

[0284] В некоторых аспектах, последовательность трансгена, интегрированная в клетку, включает кодирующие и/или не кодирующие последовательности и/или их частичные кодирующие последовательности, которые вставлены или интегрированы в геном клетки. В некоторых аспектах, интеграция может являться случайной, полуслучайной или направленной. В некоторых аспектах, последовательности трансгена могут содержать фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты, содержащие аранжировки, не встречающиеся в природе, такие как фрагменты из различных источников, соединенные вместе. В некоторых аспектах, последовательность трансгена представляет собой не встречающуюся в природе последовательность. В некоторых вариантах осуществления, последовательность трансгена не кодирует полный вирусный белок gag. В некоторых вариантах осуществления, последовательность трансгена не содержит полный геном HIV, компетентный по репликации вирусный геном, и/или вспомогательные гены, где вспомогательные гены, необязательно, представляют собой Nef, Vpr, Vpx, Vif и/или Vpg. В некоторых аспектах, последовательность трансгена содержится в полинуклеотиде, который вводят в клетку, например, в соответствии со способами введения полинуклеотида, описанными в настоящем описании. В некоторых аспектах, последовательность трансгена кодирует, полностью или частично, один или несколько рекомбинантных белков. В некоторых аспектах, рекомбинантный белок, кодируемый последовательностью трансгена, представляет собой рекомбинантный

рецептор, такой как химерный рецептор антигена (CAR) или рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления, последовательность трансгена кодирует один или несколько дополнительных рекомбинантных белков.

[0285] В некоторых аспектах, последовательность трансгена также содержит один или несколько не кодирующих, регуляторных или контрольных элементов, таких как промотор, энхансер, посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE), интрон, инсулятор, сигнал полиаденилирования, последовательность терминации транскрипции, консенсусную последовательность Козак, мультицистронный элемент (например, внутренние участки связывания рибосомы (IRES), последовательность 2A), последовательности, соответствующие нетранслируемым областям (UTR) матричной РНК (мРНК) и акцепторные или донорные последовательности сплайсинга.

[0286] В некоторых аспектах, любую часть последовательности трансгена, подлежащего интеграции, можно детектировать для определения присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в любом из способов, представленных в настоящем описании. В некоторых аспектах, часть последовательности трансгена, которую детектируют, может представлять собой часть, находящуюся внутри последовательности, которая является гетерологичной, экзогенной или трансгенной для клетки, так что интегрированную гетерологичную, экзогенную или трансгенную последовательность можно специфически детектировать и отличать от любых сходных эндогенных геномных последовательностей клетки. В некоторых аспектах, способ определения присутствия, отсутствия или количества, такой как любые, описанные в настоящем описании, например, в разделе I выше, можно осуществлять с использованием зондов, которые могут специфически детектировать часть последовательности трансгена, или последовательностей праймеров, которые могут специфически амплифицировать часть последовательности трансгена. В некоторых аспектах, последовательности зонда или праймера могут специфически детектировать, связывать или узнавать часть последовательности трансгена, такую как часть последовательности трансгена, которая является гетерологичной, экзогенной или трансгенной для клетки. В некоторых аспектах, последовательности зонда или праймера могут специфически детектировать, связывать или узнавать часть последовательности трансгена, такую как часть последовательности трансгена, интегрированная в геном. В некоторых вариантах осуществления, последовательность трансгена не кодирует вирусный белок gag.

[0287] В некоторых вариантах осуществления, последовательность трансгена содержит один или несколько промоторов, функционально связанных для контроля экспрессии кодированного рекомбинантного белка, например, рекомбинантного рецептора. В некоторых примерах, последовательность трансгена содержит два, три или более промоторов, функционально связанных для контроля экспрессии кодированного рекомбинантного белка. В некоторых вариантах осуществления, последовательность трансгена может содержать регуляторные последовательности, кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые являются специфическими для типа

хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), для введения которому предназначена последовательность трансгена, в соответствии с тем и принимая во внимание то, является ли последовательность трансгена основанной на ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления, последовательность трансгена может содержать регуляторные/контрольные элементы, такие как промотор, энхансер, посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE), интрон, сигнал полиаденилирования, консенсусную последовательность Козак, внутренние участки связывания рибосомы (IRES), последовательность 2A, и акцептор или донор сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления, последовательность трансгена может содержать неприродный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей рекомбинантный белок и/или один или несколько дополнительных полипептид(ов). В некоторых вариантах осуществления, промотор выбран из промотора РНК pol I, pol II или pol III. В некоторых вариантах осуществления, промотор поддается узнаванию РНК-полимеразой II (например, CMV, ранняя область SV40 или главный поздний промотор аденовируса). В другом варианте осуществления, промотор поддается узнаванию РНК-полимеразой III (например, промотор U6 или H1). В некоторых вариантах осуществления, промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, такой как промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор, обнаруженный в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мыши. Могут быть также предусмотрены другие известные промоторы.

[0288] В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой или содержит конститутивный промотор. Иллюстративные конститутивные промоторы включают, например, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), немедленный ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор убиквитина С человека (UBC), промотор фактора элонгации 1 α человека (EF1 α), промотор фосфолипидкиназы 1 мышцы (PGK) и промотор β -актина курицы в сочетании с ранним энхансером CMV (CAGG). В некоторых вариантах осуществления, конститутивный промотор представляет собой синтетический или модифицированный промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой или содержит промотор MND, синтетический промотор, содержащий область U3 из модифицированного LTR MoMuLV с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы (см. Challita et al. (1995) J. Virol. 69(2):748-755). В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В другом варианте осуществления, промотор представляет собой вирусный промотор. В другом варианте осуществления, промотор представляет собой невирусный промотор. В некоторых вариантах осуществления, иллюстративные промоторы могут включать, но без ограничения, промотор фактора элонгации 1 альфа человека (EF1 α) или его модифицированную форму, или промотор MND.

[0289] В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой регулируемый промотор (например, индуцируемый промотор). В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой индуцируемый промотор или

репрессируемый промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор содержит последовательность оператора Lac, последовательность тетрациклинового оператора, последовательность галактозного оператора или последовательность доксицилинового оператора, или представляет собой их аналог, или является способным к связыванию или узнаванию репрессором Lac или тетрациклиновым репрессором, или их аналогом. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид не включает регуляторный элемент, например, промотор.

[0290] В некоторых аспектах, последовательность трансгена содержит регуляторный элемент, который может усиливать экспрессию кодированного рекомбинантного белка, такой как посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE), такой как цис-действующие посттранскрипционные регуляторные элементы. В некоторых аспектах, последовательность трансгена содержит регуляторный элемент, который может усиливать экспрессию кодированного рекомбинантного белка, такой как посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE), функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент представляет собой вирусный посттранскрипционный регуляторный элемент или его модифицированную форму, такой как PRE, происходящий из вирусов гепатита, таких как вирус гепатита сурков (WHV) или вирус гепатит В (HBV), например, посттранскрипционные регуляторные элементы вирусов гепатита (HPRE), такие как посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE), посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита В (HBVPRE). Происходящие из вирусов гепатита PRE, включая WPRE и HBVPRE, могут в общем стимулировать, например, усиливать, экспрессию кодирующих последовательностей, функционально связанных с ними, посредством облегчения посттранскрипционного экспорта РНК из ядра. Вторичные и третичные структуры, сформированные цис-действующими последовательностями или элементами, содержащимися внутри PRE, могут стимулировать такие функции. Например, происходящие из вируса гепатита дикого типа PRE, как правило, включают альфа-субэлемент и бета-субэлемент, каждый из которых независимо формирует структуры стебля-петли, которые оказывают влияние на и/или вовлечены в посттранскрипционную активность полного PRE (Smith et al. (1998) *Nucleic Acids Research*, 26:4818-4827). Некоторые PRE из вируса гепатита дикого типа, не относящегося к вирусу человека, такие как WPRE, также включают гамма-субэлемент, который может дополнительно усиливать посттранскрипционную активность. Такие субэлементы могут иметь или кодировать РНК, имеющие структуры, которые способствуют экспорту РНК из ядра, например, посредством взаимодействия с зависимым и/или не зависимым от CRM1-аппаратом экспорта, обеспечивают участки связывания для клеточных белков, увеличивают общее количество транскриптов РНК, например, рекомбинантной и/или гетерологичной РНК, увеличивают стабильность РНК, увеличивают количество полиаденилированных транскриптов и/или увеличивают размер полиаденилированных хвостов в таких

транскриптах. В некоторых вариантах осуществления, посттранскрипционный регуляторный элемент представляет собой посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE).

[0291] В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. В некоторых аспектах, сигнальная последовательность может кодировать сигнальный пептид, происходящий из нативного полипептида. В других аспектах, сигнальная последовательность может кодировать гетерологичный или неприродный 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 некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор антигена (CAR), содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Неограничивающие иллюстративные сигнальные пептиды 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.

[0292] В некоторых вариантах осуществления, последовательность трансгена содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько дополнительных полипептидов, например, один или несколько маркер(ов) и/или одну или несколько эффекторных молекул. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько маркер(ов) включает маркер трансдукции, суррогатный маркер и/или маркер для отбора. Среди введенных дополнительных последовательностей нуклеиновой кислоты, например, кодирующих один или несколько дополнительных полипептид(ов), включены последовательности нуклеиновой кислоты, которые могут улучшать эффективность терапии, например, посредством стимуляции жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; последовательности нуклеиновой кислоты для предоставления генетического маркера для отбора и/или оценки клеток, например, для оценки выживаемости или локализации *in vivo*; последовательности нуклеиновой кислоты для улучшения безопасности, например, посредством придания клетке чувствительности 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); см. также WO 1992008796 и WO 1994028143, описывающие использование бифункциональных поддающихся отбору слитых генов, полученных в результате слияния доминантного положительного селективного маркера с отрицательным селективным маркером, и Патент США No. 6040177.

[0293] В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой маркер трансдукции или суррогатный маркер. Маркер трансдукции или суррогатный маркер можно использовать для детекции клеток, в которые введена последовательность

нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, маркер трансдукции может показывать или подтверждать модификацию клетки. В некоторых вариантах осуществления, суррогатный маркер представляет собой белок, который подвергают совместной экспрессии на поверхности клетки с рекомбинантным белком, например, рекомбинантным рецептором, таким как CAR. В конкретных вариантах осуществления, такой суррогатный маркер представляет собой поверхностный белок, модифицированный, чтобы иметь небольшую активность или не иметь активности. В конкретных вариантах осуществления, суррогатный маркер кодирован той же самой последовательностью трансгена, которая кодирует рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, является функционально связанной с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер, необязательно, отделенной внутренним участком связывания рибосомы (IRES), или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид, или пептид, который вызывает проскальзывание рибосомы, такой как 2A. Внешние маркерные гены можно, в некоторых случаях, использовать в сочетании с модифицированной клеткой, чтобы позволять детекцию или отбор клеток и, в некоторых случаях, также стимулировать уничтожение клетки и/или самоубийство клетки.

[0294] Иллюстративные суррогатные маркеры могут включать укороченные формы полипептидов поверхности клетки, такие как укороченные формы, которые являются нефункциональными и не передают или являются неспособными передавать сигнал, или сигнал, обычно передаваемый полноразмерной формой полипептида поверхности клетки, и/или которые не подвергаются или являются неспособными подвергаться интернализации. Иллюстративные укороченные полипептиды поверхности клетки включают укороченные формы факторов роста или других рецепторов, такие как укороченный рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (tHER2), укороченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR, иллюстративная последовательность tEGFR, указанная в SEQ ID NO: 7 или 16) или специфический для предстательной железы мембранный антиген (PSMA) или его модифицированную форму, такую как укороченный PSMA (tPSMA). В некоторых аспектах, tEGFR может содержать эпитоп, узнаваемый антителом цетуксимабом (эрбитуксом®) или другим терапевтическим антителом против EGFR, или связывающей молекулой, который можно использовать для идентификации или отбора клеток, модифицированных с использованием конструкции tEGFR и кодируемого экзогенного белка, и/или для уничтожения или отделения клеток, экспрессирующих кодируемый экзогенный белок. См. Патент США No. 8802374 и Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434). В некоторых аспектах, маркер, например, суррогатный маркер, включает весь или часть (например, укороченную форму) CD34, NGFR, CD19 или укороченный CD19, например, укороченный не относящийся к человеку CD19. Иллюстративный полипептид укороченного EGFR (например, tEGFR) содержит

последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 7 или 16, или последовательность аминокислот, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 или 16.

[0295] В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит поддающийся детекции белок, такой как флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперсвернутый GFP (sfGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-зеленый флуоресцентный белок (BFP), улучшенный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP), и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты, подвергнутые оптимизации кодонного состава, стабилизированные и/или улучшенные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит фермент, такой как люцифераза, продукт гена lacZ из *E. coli*, щелочная фосфатаза, секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Иллюстративные гены светоиспускающих репортеров включают гены люциферазы (*luc*), β -галактозидазы, хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT), β -глюкуронидазы (GUS) или их варианты. В некоторых аспектах, экспрессию фермента можно детектировать посредством добавления субстрата, который можно детектировать при экспрессии и функциональной активности фермента.

[0296] В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой маркер для отбора. В некоторых вариантах осуществления, маркер для отбора представляет собой или содержит полипептид, придающий устойчивость к экзогенным средствам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления, маркер для отбора представляет собой ген устойчивости к антибиотику. В некоторых вариантах осуществления, маркер для отбора представляет собой ген устойчивости к антибиотику, придающий устойчивость к антибиотику клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, маркер для отбора 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 модифицированную форму.

[0297] Любой из рекомбинантных белков, например, рекомбинантный рецептор, и/или дополнительные полипептид(ы), описанные в настоящем описании, могут быть кодированы одной или несколькими последовательностями трансгена, содержащими одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, в любых комбинациях, ориентации или аранжировках. Например, одна, две, три или более последовательности трансгена могут кодировать один, два, три или более различных полипептидов, например,

рекомбинантный рецептор, или их части или компоненты, и/или один или несколько дополнительных полипептид(ов), например, маркерную и/или эффекторную молекулу. В некоторых вариантах осуществления, одна последовательность трансгена содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, такой как CAR, или его части или компоненты, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько дополнительных полипептид(ов). В некоторых вариантах осуществления, один вектор или конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, такой как CAR, или его части или компоненты, и отдельные вектор или конструкция содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько дополнительных полипептид(ов). В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая один или несколько дополнительных полипептид(ов), являются функционально связанными с двумя различными промоторами. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, присутствует выше нуклеиновой кислоты, кодирующей один или несколько дополнительных полипептид(ов). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, присутствует ниже нуклеиновой кислоты, кодирующей один или несколько дополнительных полипептид(ов).

[0298] В конкретных случаях, одна последовательность трансгена содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие две или более различных полипептидных цепей, например, рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, и один или несколько дополнительных полипептид(ов), например, маркерную и/или эффекторную молекулу. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие две или более различных полипептидных цепей, например, рекомбинантные белки, например, рекомбинантный рецептор, и один или несколько дополнительных полипептид(ов), присутствуют в двух отдельных последовательностях трансгена. Например, представлены две отдельные последовательности трансгена, и каждую можно индивидуально переносить или вводить в клетку для экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие маркер и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, присутствуют или вставлены в различных локализациях в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие маркер, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, являются функционально связанными с двумя различными промоторами.

[0299] В некоторых вариантах осуществления, таких как варианты, в которых последовательность трансгена содержит первую и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, где кодирующие последовательности, каждая из которых кодирует различные полипептидные цепи, могут являться функционально связанными с промоторами, которые могут являться одинаковыми или различными. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты может содержать промотор, управляющий экспрессией двух или более различных полипептидных цепей. В некоторых вариантах осуществления, такие молекулы нуклеиновой кислоты могут являться мультицистронными (бицистронными или трицистронными, см., например, Патент США No. 6060273). В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие один или несколько дополнительных полипептид(ов) являются функционально связанными с одним и тем же промотором и являются, необязательно, отделенными внутренним участком связывания рибосомы (IRES), или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, вызывающий проскальзывание рибосомы, такой как элемент 2A. Например, иллюстративный маркер, и необязательно, последовательность проскальзывания, могут являться такими, как описано в Публикации PCT No. WO2014031687.

[0300] В некоторых вариантах осуществления, транскрипционные единицы могут являться модифицированными в форме бицистронной единицы, содержащей IRES, что позволяет совместную экспрессию продуктов генов (например, кодирующих рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор и дополнительный полипептид) посредством матричной РНК с одного промотора. Альтернативно, в некоторых случаях, один промотор может управлять экспрессией РНК, содержащей, в одной открытой рамке считывания (ORF), два или три гена (например, кодирующий маркер и кодирующий рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор), отделенные друг от друга последовательностями, кодирующими саморасщепляющийся пептид (например, последовательностями 2A) или участок узнавания протеазы (например, фурина). ORF, таким образом, кодирует один полипептид, который, либо в ходе (в случае 2A), либо после трансляции, подвергается процессингу до индивидуальных белков. В некоторых случаях, пептид, такой как T2A, может заставлять рибосому пропускать (проскальзывание рибосомы) синтез пептидной связи на С-конце элемента 2A, что приводит к разделению между концом последовательности 2A и следующим ниже пептидом (см., например, de Felipe, *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) и de Felipe et al. *Traffic* 5:616-626 (2004)). Известны различные элементы 2A. Примеры последовательностей 2A, которые можно использовать в способах и системе, описанных в настоящем описании, включают, без ограничения, последовательности 2A из вируса ящура (F2A, например, SEQ ID NO: 21), вируса ринита лошадей A (E2A, например, SEQ ID NO: 20), вируса *Thossea asigna* (T2A, например, SEQ ID NO: 6 или 17) и тешовируса-1

свиной (P2A, например, SEQ ID NO: 18 или 19), как описано в Публикации Патента США No. 20070116690.

А. Рекомбинантные рецепторы

[0301] В некоторых вариантах осуществления, клетки или композиции клеток, которые оценивают по интеграции последовательностей трансгена, содержат последовательности трансгена, кодирующие рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, последовательности трансгена включают последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие рекомбинантный рецептор, и другие элементы, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный белок, кодируемый интегрированными последовательностями трансгена, представляет собой рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, последовательности трансгена кодируют рекомбинантный рецептор или его часть. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые обрабатывают, перерабатывают, модифицируют и/или получают, как описано в настоящем описании, например, в разделе I, содержат или экспрессируют, или являются модифицированными для содержания или экспрессии, рекомбинантного белка, такого как рекомбинантный рецептор, например, химерный рецептор антигена (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). В конкретных вариантах осуществления, описанными способами получения или модификации получают и/или обеспечивают возможность получения клеток, или популяций или композиций, содержащих клетки и/или обогащенных по клеткам, модифицированным для экспрессии или содержания рекомбинантного белка, такого как рекомбинантный рецептор, благодаря интеграции последовательностей трансгена. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки или популяции, или композиции Т-клеток, обрабатывают, перерабатывают, модифицируют и/или получают.

[0302] В некоторых аспектах, кодированный рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR) или рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR). Среди рекомбинантных рецепторов присутствуют химерные рецепторы, рецепторы антигенов и рецепторы, содержащие один или несколько компонентов химерных рецепторов или рецепторов антигенов. Рекомбинантные рецепторы могут включать рецепторы, содержащие лигандсвязывающие домены или их связывающие фрагменты и внутриклеточные передающие сигналы домены или области. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные рецепторы, кодированные модифицированными клетками, включают функциональные не относящиеся к TCR рецепторы антигенов, химерные рецепторы антигенов (CAR), химерный рецептор аутоантител (CAAR), рекомбинантные Т-клеточные рецепторы (TCR) и области, домены или компоненты любого из вышеуказанных, включая одну или несколько полипептидных цепей многоцепочечного рекомбинантного рецептора. Рекомбинантный рецептор, такой как CAR, как правило, включает внеклеточный связывающий антиген (или лиганд) домен, связанный с одним или несколькими внутриклеточными передающими сигналами компонентами, в некоторых аспектах, посредством линкеров и/или трансмембранных

домена(доменов). В некоторых вариантах осуществления, иллюстративные рекомбинантные рецепторы, экспрессированные из модифицированной клетки, включают многоцепочечные рецепторы, содержащие два или более полипептидов рецептора, которые, в некоторых случаях, содержат различные компоненты, домены или области. В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор содержит два или более полипептида, которые совместно составляют функциональный рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, многоцепочечный рецептор представляет собой двухцепочечный рецептор, содержащий два полипептида, которые совместно составляют функциональный рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой TCR, содержащий два различных полипептида рецептора, например, цепь TCR-альфа (TCR α) и TCR-бета (TCR β); или цепь TCR-гамма (TCR γ) и TCR-дельта (TCR δ). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой многоцепочечный рецептор, в котором один или несколько полипептидов регулируют, модифицируют или контролируют экспрессию, активность или функцию другого полипептида рецептора. В некоторых аспектах, многоцепочечные рецепторы позволяют пространственную или временную регуляцию или контроль специфичности, активности, связывания антигена (или лиганда), функцию и/или экспрессию рецептора.

1. Химерные рецепторы антигенов (CAR)

[0303] В некоторых вариантах осуществления, кодируемый рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR) со специфичностью для конкретного антигена (или маркера или лиганда), такого как антиген, экспрессированный на поверхности конкретного типа клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления, он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, антиген является избирательно экспрессированным или сверхэкспрессированным на клетках, пораженных заболеванием или состоянием, например, клетках опухоли или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления, антиген является экспрессированным на нормальных клетках и/или является экспрессированным на модифицированных клетках.

[0304] В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор, содержит внутриклеточную передающую сигналы область, включающую цитоплазматические передающие сигналы домен или область (также взаимозаменяемо называемые внутриклеточными передающими сигналами доменом или областью), такие как цитоплазматическая (внутриклеточная) область, способная индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, например, цитоплазматические передающие сигналы домен или область компонента Т-клеточного рецептора (TCR) (например, цитоплазматические передающие сигналы домен или область цепи дзета из цепи CD3-дзета (CD3 ζ) или их функциональный вариант или передающую сигналы часть), и/или содержащая иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

[0305] В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор дополнительно содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, который специфически связывается с лигандом (например, антигеном) - антигеном. В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор представляет собой CAR, содержащий внеклеточный узнающий антиген домен, который специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, такой как антиген, представляет собой белок экспрессированный на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, CAR представляет собой TCR-подобный CAR, и антиген представляет собой процессированный пептидный антиген, такой как пептидный антиген из внутриклеточного белка, который, подобно TCR, поддается узнаванию на поверхности клетки в контексте молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС).

[0306] Иллюстративные рецепторы антигенов, включая CAR, и способы конструирования и введения таких рецепторов в клетки, включают способы, описанные, например, в публикациях международных патентных заявок номер WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, в публикациях Патентных заявок США номер US2002131960, US2013287748, US20130149337, в Патентах США No.: 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353 и 8479118, и в Европейской патентной заявке номер 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 некоторых аспектах, рецепторы антигенов включают CAR, как описано в Патенте США No.: 7446190, и рецепторы, описанные в Публикации международной патентной заявки No.: WO/2014055668 A1. Примеры CAR включают CAR, как описано в любой из вышеупомянутых публикаций, таких как WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, Патент США No.: 7446190, Патент США No.: 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). См. также WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, Патент США No.: 7446190 и Патент США No.: 8389282.

[0307] В некоторых вариантах осуществления, CAR конструируют со специфичностью для конкретного антигена (или маркера, или лиганда), такого как антиген, экспрессированный в конкретном типе клеток, подлежащем нацеливанию посредством адоптивной терапии, например, маркера злокачественной опухоли, и/или антигена, предназначенного для индукции ослабления ответа, например, антигена, экспрессирующегося в клетках нормального или не пораженного заболеванием типа. Таким образом, CAR, как правило, включает, в своей 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 молекул антител. В некоторых вариантах

осуществления, CAR включает антигенсвязывающую часть или части молекулы антитела, такую как одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), происходящий из вариабельной тяжелой (V_H) и вариабельной легкой (V_L) цепей моноклонального антитела (mAb).

[0308] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть экспрессированы на клетках в качестве части рекомбинантного рецептора, такого как рецептор антигена. Среди рецепторов антигенов присутствуют функциональные не относящиеся к TCR рецепторы антигенов, такие как химерные рецепторы антигенов (CAR). Как правило, CAR, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, имеющие подобную TCR специфичность, направленную против комплексов пептид-МНС, также может быть обозначен как TCR-подобный CAR. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфический для комплекса МНС-пептид, из TCR-подобного CAR, соединен с одним или несколькими компонентами для передачи внутриклеточных сигналов, в некоторых аспектах, посредством линкеров и/или трансмембранного домена(доменов). В некоторых вариантах осуществления, такие молекулы могут, как правило, имитировать или приблизительно воспроизводить сигнал через природный рецептор антигена, такой как TCR, и, необязательно, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором.

[0309] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор (например, CAR), включает лигандсвязывающий домен, который связывается, например, специфически связывается, с антигеном (или лигандом). Среди антигенов, на которые нацелены химерные рецепторы, присутствуют антигены, экспрессирующиеся в контексте заболевания, состояния или типа клеток, подлежащих нацеливанию посредством адоптивной клеточной терапии. Среди заболеваний и состояний присутствуют пролиферативные, неопластические и злокачественные заболевания и нарушения, включая злокачественные опухоли и опухоли, включая гематологические злокачественные опухоли, злокачественные опухоли иммунной системы, такие как лимфомы, лейкозы и/или миеломы, такие как B-, T- и миелоидные лейкозы, лимфомы и множественные миеломы.

[0310] В некоторых вариантах осуществления, антиген (или лиганд) представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления, он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, антиген (или лиганд) является избирательно экспрессированным или сверхэкспрессированным на клетках, пораженных заболеванием или состоянием, например, клетках опухоли или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления, антиген является экспрессированным на нормальных клетках и/или является экспрессированным на модифицированных клетках.

[0311] В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), специфически узнающие антиген, такой как интактный антиген, экспрессированный на поверхности клетки.

[0312] В некоторых вариантах осуществления, антиген (или лиганд) представляет собой антиген опухоли или маркер злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления, антиген (или лиганд) представляет собой или включает интегрин $\alpha\nu\beta 6$ (интегрин $\alpha\nu\beta 6$), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, раково/тестикулярный антиген 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, лиганд 1 хемокинов с мотивом C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор эпидермальный фактор роста с мутацией типа III (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин B2, рецептор эфрина A2 (EPHa2), рецептор эстрогена, подобный рецептору Fc белок 5 (FCRL5; также известный как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетальный рецептор ацетилхолина (фетальный AchR), связывающий фолат белок (FBP), рецептор-альфа фолата, ганглиозид GD2, О-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), сопряженный с G-белком рецептор, класса C, группы 5, член D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторную тирозинкиназу erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, ассоциированный с меланомой высокомолекулярный антиген человека (HMW-MAA), поверхностный антиген вируса гепатита В, человеческий лейкоцитарный антиген A1 (HLA-A1), человеческий лейкоцитарный антиген A2 (HLA-A2), рецептор альфа IL-22 (IL-22R α), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13R α 2), рецептор, содержащий домен вставки киназы (kdr), легкую цепь каппа, молекулу клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитоп CE7 из L1-CAM, член A семейства 8, содержащего богатые лейцином повторы (LRRC8A), Lewis Y, ассоциированный с меланомой антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), с-Met, мышинный цитомегаловирус (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды члена D группы 2 естественных киллеров (NKG2D), мелан А (MART-1), молекулу адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетальный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простатспецифический антигена, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простатспецифический мембранный антиген (PSMA), подобный рецепторной тирозинкиназе орфанный рецептор 1 (ROR1), сурвивин, гликопротеин трофобластов (TPBG также известный как 5T4), опухолиассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), родственный тирозиназе белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), родственный тирозиназе белок 2 (TRP2, также известный как допахром-таутомераза, допахром-дельта-изомераза или DCT), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), антиген опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфический для патогена или экспрессируемый патогеном антиген, или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессированные HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

Антигены, на которые нацелены рецепторы, в некоторых вариантах осуществления, включают антигены, ассоциированные с злокачественным новообразованием из В-клеток, такие как любой из ряда известных маркеров В-клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой или включает CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig каппа, Ig лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

[0313] В некоторых вариантах осуществления, CAR представляет собой CAR против ВСМА, который является специфическим для ВСМА, например, ВСМА человека. Химерные рецепторы антигенов, содержащие антитела против ВСМА, включая антитела мыши против ВСМА человека и антитела человека против ВСМА человека, и клетки, экспрессирующие такие химерные рецепторы, описаны ранее. См. Carpenter et al., Clin Cancer Res., 2013, 19(8):2048-2060, WO 2016/090320, WO2016090327, WO2010104949A2 и WO2017173256. В некоторых вариантах осуществления, CAR против ВСМА содержит антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержащий вариабельную тяжелую (V_H) и/или вариабельную легкую (V_L) область, происходящую из антитела, описанного в WO 2016/090320 или WO2016090327. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , указанную в SEQ ID NO: 30, и V_L , указанную в SEQ ID NO:31. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , указанную в SEQ ID NO: 32, и V_L , указанную в SEQ ID NO:33. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , указанную в SEQ ID NO: 34, и V_L , указанную в SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , указанную в SEQ ID NO: 27, и V_L , указанную в SEQ ID NO:28. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , указанную в SEQ ID NO: 41 и V_L , указанную в SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , указанную в SEQ ID NO: 43 и V_L , указанную в SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H , указанную в SEQ ID NO: 45 и V_L , указанную в SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, V_H или V_L имеет последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с любыми из вышеуказанных последовательностей V_H или V_L и сохраняет связывание с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, область V_H является амино-концевой по отношению к области V_L . В некоторых вариантах осуществления, область V_H является карбокси-концевой по отношению к области V_L .

[0314] В некоторых вариантах осуществления, CAR представляет собой CAR против CD19, который является специфическим для CD19, например, CD19 человека. В некоторых вариантах осуществления домены scFv и/или V_H происходят из FMC63. FMC63 в общем относится к мышинному моноклональному антителу IgG1, образованному против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R.,

et al. (1987). Leucocyte typing III. 302). В некоторых вариантах осуществления, антитело FMC63 содержит последовательности CDR-H1 и CDR-H2, указанные в SEQ ID NO: 50 и 51, соответственно, и CDR-H3, указанную в SEQ ID NO: 52 или 66, и CDR-L1, указанную в SEQ ID NO: 47, и CDR-L2, указанную в SEQ ID NO: 48 или 67 и CDR-L3, указанную в SEQ ID NO: 49 или 68. В некоторых вариантах осуществления, антитело FMC63 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 53, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 54.

[0315] В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDR-L1 из SEQ ID NO:47, последовательность CDR-L2 из SEQ ID NO:48 и последовательность CDR-L3 из SEQ ID NO:49, и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR-H1 из SEQ ID NO:50, последовательность CDR-H2 из SEQ ID NO:51 и последовательность CDR-H3 из SEQ ID NO:52. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO:53, и переменную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO:54. В некоторых вариантах осуществления, переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, линкер указан в SEQ ID NO:29. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, в следующем порядке, V_H , линкер и V_L . В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, в следующем порядке, V_L , линкер и V_H . В некоторых вариантах осуществления, scFv кодирован последовательностью нуклеотидов, указанной в SEQ ID NO:69, или последовательностью, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:69. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:55, или последовательностью, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:55.

[0316] В некоторых вариантах осуществления scFv происходит из SJ25C1. SJ25C1 представляет собой мышиное моноклональное антитело IgG1, образованное против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., et al. (1987). Leucocyte typing III. 302). В некоторых вариантах осуществления, антитело SJ25C1 содержит последовательность CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, указанную в SEQ ID NO: 59-61, соответственно, и последовательность CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, указанную в SEQ ID NO: 56-58, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, антитело SJ25C1 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 62, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, svFv содержит переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDR-L1 из SEQ ID NO:56, последовательность CDR-L2

из SEQ ID NO: 57, и последовательность CDR-L3 из SEQ ID NO:58, и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR-H1 из SEQ ID NO:59, последовательность CDR-H2 из SEQ ID NO:60 и последовательность CDR-H3 из SEQ ID NO:61. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO:62, и переменную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO:63. В некоторых вариантах осуществления, переменная тяжелая и переменная легкая цепь соединены посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, линкер указан в SEQ ID NO:64. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, в следующем порядке, V_H , линкер и V_L . В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, в следующем порядке, V_L , линкер и V_H . В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:65, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:65.

[0317] В некоторых вариантах осуществления, CAR представляет собой CAR против CD20, который является специфическим для CD20. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L , происходящие из антитела или фрагмента антитела, специфического для CD20. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, связывающие CD20 представляют собой антитело, представляющее собой или происходящее из ритуксимаба, такое как scFv ритуксимаба.

[0318] В некоторых вариантах осуществления, CAR представляет собой CAR против CD22, который является специфическим для CD22. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L , происходящие из антитела или фрагмента антитела, специфического для CD22. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, связывающие CD22, представляют собой антитело, представляющее собой или происходящее из m971, такое как scFv m971.

[0319] В некоторых вариантах осуществления, CAR представляет собой CAR против GPRC5D, который является специфическим для GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L , происходящие из антитела или фрагмента антитела, специфического для GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, связывающие GPRC5D, представляют собой или содержат V_H и V_L из антитела или фрагмента антитела, указанного в Публикациях международных патентных заявок номер WO 2016/090329 и WO 2016/090312.

[0320] В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, такой как scFv, который включает один или несколько линкеров, соединяющих два домена или области антитела, таких как переменная область тяжелой цепи (V_H) и переменная область легкой цепи (V_L). Линкер, как правило, представляет собой пептидный линкер, например, гибкий и/или растворимый пептидный линкер. Среди линкеров присутствуют линкеры, богатые глицином и серином, и/или, в некоторых случаях, треонином. В некоторых вариантах осуществления, линкеры

дополнительно включают заряженные остатки, такие как лизин и/или глутамат, которые могут улучшать растворимость. В некоторых вариантах осуществления, линкеры дополнительно включают один или несколько остатков пролина. В некоторых аспектах, линкеры, богатые глицином и серином, (и/или треонином) включают по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% такой аминокислоты(аминокислот). В некоторых вариантах осуществления, они включают по меньшей мере или приблизительно 50%, 55%, 60%, 70% или 75% глицина, серина и/или треонина. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит по существу полностью из глицина, серина и/или треонина. Линкеры, как правило, имеют длину между приблизительно 5 и приблизительно 50 аминокислот, как правило, между точно или приблизительно 10 и точно или приблизительно 30, например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, и в некоторых примерах, между 10 и 25 аминокислот. Иллюстративные линкеры включают линкеры, имеющие различные количества повторов последовательности GGGGS (4GS; SEQ ID NO:36) или GGGS (3GS; SEQ ID NO:37), например, между 2, 3, 4 и 5 повторами такой последовательности. Иллюстративные линкеры включают линкеры, имеющие последовательность или состоящие из последовательности, указанной в SEQ ID NO:38 (GGGSGGGSGGGGS), SEQ ID NO:39 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG) или SEQ ID NO: 40 (SRGGGSGGGSGGGGSLEMA).

[0321] В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой или включает специфический для патогена или экспрессируемый патогеном антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой вирусный антиген (такой как вирусный антиген из HIV, HCV, HBV и т.д.), бактериальные антигены, и/или паразитарные антигены. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит TCR-подобное антитело, такое как антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), специфически узнающие внутриклеточный антиген, такой как опухлеассоциированный антиген, представленный на поверхности клетки в форме комплекса МНС-пептид. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающую часть, узнающие комплекс МНС-пептид, можно экспрессировать на клетках в качестве части рекомбинантного рецептора, такого как рецептор антигена. Среди рецепторов антигенов присутствуют функциональные не относящиеся к TCR рецепторы антигенов, такие как химерные рецепторы антигенов (CAR). Как правило, CAR содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, имеющие TCR-подобную специфичность, нацеленную против комплексов пептид-МНС, также может быть обозначен как TCR-подобный CAR.

[0322] Ссылка на «главный комплекс гистосовместимости» (МНС) относится к белку, как правило, гликопротеину, который содержит полиморфный участок связывания пептида или связывающую бороздку, который может, в некоторых случаях, образовывать комплекс с пептидными антигенами из полипептидов, включая пептидные антигены, процессированные клеточным аппаратом. В некоторых случаях, молекулы МНС могут

быть экспонированы или экспрессированы на поверхности клетки, включая форму комплекса с пептидом, т.е. комплекса МНС-пептид, для представления антигена в конформации, узнаваемой рецептором антигена на Т-клетках, таким как TCR или подобное TCR антитело. Как правило, молекулы МНС класса I представляют собой гетеродимеры, имеющие трансмембранную α -цепь, в некоторых случаях, с тремя α -доменами, и нековалентно связанный β 2-микроглобулин. Как правило, молекулы МНС класса II состоят из двух трансмембранных гликопротеинов, α и β , оба из которых, как правило, пересекают мембрану. Молекула МНС может включать эффективный участок МНС, который содержит антигенсвязывающий участок или участки для связывания пептида, и последовательности, необходимые для узнавания соответствующим рецептором антигена. В некоторых вариантах осуществления, молекулы МНС класса I доставляют пептиды, образованные в цитозоле, к поверхности клетки, где комплекс МНС-пептид узнают Т-клетки, как правило, такие как $CD8^+$ Т-клетки, но, в некоторых случаях, $CD4^+$ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, молекулы МНС класса II доставляют пептиды, образованные в везикулярной системе, к поверхности клетки, где их, как правило, узнают $CD4^+$ Т-клетки. Как правило, молекулы МНС кодированы группой сцепленных локусов, совместно называемых H-2 у мыши и человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA) у человека. Таким образом, как правило, МНС человека может быть также обозначен, как человеческий лейкоцитарный антиген (HLA).

[0323] Термин «комплекс МНС-пептид» или «комплекс пептид-МНС», или его варианты, относится к комплексу или ассоциации пептидного антигена и молекулы МНС, например, как правило, посредством нековалентных взаимодействий пептида в связывающей бороздке или щели молекулы МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс МНС-пептид представлен или экспонирован на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, комплекс МНС-пептид может быть специфически узнан рецептором антигена, таким как TCR, TCR-подобный CAR или их антигенсвязывающие части.

[0324] В некоторых вариантах осуществления, пептид, такой как пептидный антиген или эпитоп из полипептида, может связываться с молекулой МНС, например, для узнавания рецептором антигена. Как правило, пептид происходит из или образован на основе фрагмента более длинной биологической молекулы, такой как полипептид или белок. В некоторых вариантах осуществления, пептид, как правило, имеет длину от приблизительно 8 до приблизительно 24 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептид имеет длину от точно или приблизительно 9 до 22 аминокислот для узнавания в комплексе с МНС класса II. В некоторых вариантах осуществления, пептид имеет длину от точно или приблизительно 8 до 13 аминокислот для узнавания в комплексе с МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, после узнавания пептида в контексте молекулы МНС, например, в комплексе МНС-пептид, рецептор антигена, такой как TCR или TCR-подобный CAR, подает или запускает сигнал активации

для Т-клетки, который индуцирует ответ Т-клетки, такой как пролиферация Т-клетки, продукция цитокинов, ответ цитотоксической Т-клетки или другой ответ.

[0325] В некоторых вариантах осуществления, TCR-подобное антитело или антигенсвязывающая часть, известны или могут быть получены известными способами (см., например, Публикации патентных заявок США No. US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US20090226474; US20090304679; и Публикацию международной патентной заявки No. WO 03/068201).

[0326] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связываются с комплексом МНС-пептид, можно получать посредством иммунизации хозяина с использованием эффективного количества иммуногена, содержащего специфический комплекс МНС-пептид. В некоторых случаях, пептид из комплекса МНС-пептид представляет собой эпитоп антигена, способного связываться с МНС, такого как антиген опухоли, например, универсальный антиген опухоли, антиген миеломы или другой антиген, как описано ниже. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество иммуногена затем вводят хозяину для вызова иммунного ответа, где иммуноген сохраняет свою трехмерную форму в течение периода времени, достаточного для вызова иммунного ответа против трехмерного представления пептида в связывающей бороздке молекулы МНС. Сыворотку, собранную от хозяина, затем анализируют для определения того, продуцированы ли желательные антитела, узнающие трехмерное представление пептида в связывающей бороздке молекулы МНС. В некоторых вариантах осуществления, продуцированные антитела можно оценивать для подтверждения того, что антитело может отличать комплекс МНС-пептид от отдельной молекулы МНС, отдельного представляющего интерес пептида, и комплекса МНС и не относящегося к делу пептида. Затем желательные антитела можно выделять.

[0327] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связываются с комплексом МНС-пептид, можно получать с использованием способов дисплея библиотек антител, таких как фаговые библиотеки антител. В некоторых вариантах осуществления, можно получать библиотеки фагового дисплея для мутантного Fab, scFv или других форм антитела, например, в которых члены библиотеки мутированы в одном или нескольких остатках CDR или нескольких CDR. См., например, Публикацию патентной заявки США No. US20020150914, US2014/0294841; и Cohen CJ. et al. (2003) J Mol. Recogn. 16:324-332.

[0328] Термин «антитело» использован в настоящем описании в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая фрагменты антигенсвязывающих (Fab) фрагментов, фрагменты F(ab')₂, фрагменты Fab', фрагменты Fv, фрагменты рекомбинантного IgG (rIgG), переменные области тяжелой цепи (V_H), способные специфически связывать антиген, одноцепочечные фрагменты антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), и фрагменты

однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, нанотело). Термин включает генетически модифицированные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интраантитела, пептидные антитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, мультиспецифические, например, биспецифические, антитела, диатела, триатела и тетратела, tandemный ди-scFv, tandemный три-scFv. Если не указано иное, термин «антитело» следует понимать как включающий их функциональные фрагменты антител. Термин включает также интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD.

[0329] Термины «определяющая комплементарная область» и «CDR», синонимические с «гиперварибельная область» или «HVR», известны, в некоторых случаях, для обозначения не являющихся непрерывными последовательностей аминокислот в варибельных областях антитела, придающих специфичность и/или аффинность связывания антигена. Как правило, присутствуют три CDR в каждой варибельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой варибельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). «Каркасные области» и «FR» известны, в некоторых случаях, для обозначения не относящихся к CDR частей варибельных областей тяжелой и легкой цепей. Как правило, присутствуют четыре FR в каждой полноразмерной варибельной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4), и четыре FR в каждой полноразмерной варибельной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4).

[0330] Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR или FR можно легко определять с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая описанные в 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. («контактная» схема нумерации); Lefranc MP et al., «IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains», Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации «IMGT»); Honegger A and Plückthun A, «Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool», J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (схема нумерации «Aho»); и Martin et al., «Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm», PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (схема нумерации «AbM»).

[0331] Границы данной CDR или FR могут меняться, в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Kabat основана на выравниваниях структуры, в то время как схема Chothia основана на структурной информации. Нумерация для обеих схем Kabat и Chothia основана на наиболее распространенной длине последовательностей областей антитела, с вставками, приспособленными посредством

вставки букв, например, «30a», и делециями, возникающими в некоторых антителах. Эти две схемы помещают определенные вставки и делеции («инделы») в различные положения, что приводит к различной нумерации. Контактная схема основана на анализе кристаллических структур комплексов и является во многих отношениях сходной со схемой нумерации Chothia. Схема AbM представляет собой компромисс между определениями Kabat и Chothia, на основании того, что используют в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular.

[0332] В таблице 1, ниже, перечислены иллюстративные границы положений CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, как идентифицировано посредством схем Kabat, Chothia, AbM и контактной схемы, соответственно. Для CDR-H1, нумерация остатков перечислена с использованием обеих схем нумерации Kabat и Chothia. FR локализованы между CDR, например, с FR-L1, локализованной перед CDR-L1, FR-L2, локализованной между CDR-L1 и CDR-L2, FR-L3, локализованной между CDR-L2 и CDR-L3, и т.д. Следует отметить, что поскольку показанная схема нумерации Kabat помещает вставки в H35A и H35B, конец петли CDR-H1 Chothia при нумерации с использованием показанного правила нумерации Kabat меняется между H32 и H34, в зависимости от длины петли.

Таблица 1. Границы CDR, в соответствии с различными схемами нумерации.

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Контактная
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Нумерация Kabat ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Нумерация 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

[0333] Таким образом, если не указано иное, «CDR» или «определяющая комплементарность область», или индивидуально указанные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), данного антитела или его области, такой как его переменная область, следует понимать как включающие некоторую (или конкретную) определяющую комплементарность область, как определено посредством любой из вышеупомянутых схем, или других известных схем. Например, где указано, что конкретная CDR (например, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в аминокислотной последовательности данной области V_H или V_L, понятно, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (например, CDR-H3) внутри переменной области, как определено посредством любой из вышеупомянутых схем, или других известных схем. В некоторых вариантах осуществления, указаны конкретные

последовательности CDR. Иллюстративные последовательности CDR представленных антител описаны с использованием различных схем нумерации, хотя понятно, что представленное антитело может включать CDR, как описано в соответствии с любой из других вышеупомянутых схем нумерации или других схем нумерации, известных специалисту в данной области.

[0334] Подобным образом, если не указано иное, некоторую FR или индивидуальные указанные FR(несколько FR) (например, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4), данного антитела или его области, таких как его вариабельная область, следует понимать как включающие некоторую (или конкретную) каркасную область, как определено посредством любой из известных схем. В некоторых случаях, указана схема для идентификации конкретных CDR, FR, или нескольких FR или CDR, например, CDR, как определено посредством способа Kabat, Chothia, AbM или контактного способа, или других известных схем. В других случаях, приведена конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

[0335] В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающие белки, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты специфически узнают антиген полноразмерного антитела. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая и легкая цепи антитела могут являться 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 выбрана, например, из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE, в частности, выбрана, например, из IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4, более конкретно, IgG1 (например, IgG1 человека). В другом варианте осуществления, константная область легкой цепи антитела выбрана, например, из каппа или лямбда, в частности, каппа.

[0336] Среди представленных антител присутствуют фрагменты антител. «Фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но без ограничения, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; вариабельные области тяжелой цепи (V_H), одноцепочечные молекулы антител, такие как scFv и однодоменные антитела V_H; и мультиспецифические антитела, сформированные из фрагментов антител. В конкретных вариантах осуществления, антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи, такие как scFv.

[0337] Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, вовлеченному в связывание антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L, соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, где каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три CDR. (См., например, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007). Один домен V_H или V_L

может являться достаточным для обеспечения специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, связывающие конкретный антиген, можно выделять с использованием домена V_H или V_L из антитела, которое связывается с антигеном, 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).

[0338] Среди антител, включенных в представленные CAR, присутствуют фрагменты антител. «Фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но без ограничения, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; переменные области тяжелой цепи (V_H), одноцепочечные молекулы антител, такие как scFv и однодоменные антитела, содержащие только область V_H ; и мультиспецифические антитела, сформированные из фрагментов антител. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен в представленных CAR представляет собой или содержит фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H) и переменную область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления, антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие переменную область тяжелой цепи (V_H) и/или переменную область легкой цепи, такие как (V_L), такие как scFv.

[0339] Термин «переменная область» или «переменный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, вовлеченному 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 консервативные каркасные области (FR) и три CDR. (См., например, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)). Один домен V_H или V_L может являться достаточным для обеспечения специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, связывающие конкретный антиген, можно выделять с использованием домена V_H или V_L из антитела, которое связывается с антигеном, 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).

[0340] Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь или часть переменного домена тяжелой цепи, или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. В конкретных вариантах осуществления, однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит домен тяжелой цепи антитела, который специфически связывается с антигеном, таким как маркер злокачественной опухоли или антиген клеточной поверхности для клетки или заболевания, подлежащих

нацеливанию, например, клетки опухоли или клетки злокачественной опухоли, таким как любой из антигенов-мишеней, описанных в настоящем описании или известных.

[0341] Фрагменты антител можно получать различными способами, включая, но без ограничения, протеолитическое расщепление интактного антитела, так же как продукцию рекомбинантными клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления, антитела представляют собой рекомбинантно полученные фрагменты, такие как фрагменты, содержащие аранжировки, не встречающиеся в природе, такие как фрагменты с двумя или более областями или цепями антитела, соединенными посредством синтетических линкеров, например, пептидных линкеров, и/или которые невозможно получить посредством ферментного расщепления природного интактного антитела. В некоторых вариантах осуществления, фрагменты антител представляют собой scFv.

[0342] «Гуманизированное» антитело представляет собой антитело, в котором все или в основном все аминокислотные остатки CDR происходят из не относящихся к человеку CDR, и все или в основном все аминокислотные остатки FR происходят из человеческих FR. Гуманизированное антитело, необязательно, может включать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящую из человеческого антитела. «Гуманизированная форма» не относящегося к человеку антитела относится к варианту не относящегося к человеку антитела, подвергнутому гуманизации, как правило, для уменьшения иммуногенности для человека, с сохранением в то же время специфичности и аффинности исходного не относящегося к человеку антитела. В некоторых вариантах осуществления, некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены на соответствующие остатки из не относящегося к человеку антитела (например, антитела, из которого происходят остатки CDR), например, для сохранения или улучшения специфичности или аффинности антитела.

[0343] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена, включая TCR-подобные CAR, включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент включает scFv. В некоторых аспектах, химерный рецептор антигена включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, и внутриклеточную передающую сигналы область. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная передающая сигналы область содержит внутриклеточный передающий сигналы домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен представляет собой или содержит передающий первичные сигналы домен, передающий сигналы домен, способный индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, передающий сигналы домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR), и/или передающий сигналы домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

[0344] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, такой как CAR, такой как его часть антитела, дополнительно включает спейсер, который может

представлять собой или включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина или его варианта или модифицированного варианта, такую как шарнирная область, например, шарнирная область IgG4 и/или C_H1/C_L, и/или Fc область. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор дополнительно содержит спейсер и/или шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть происходит из IgG человека, такого как IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах, часть константной области служит в качестве спейсерной области между узнающим антиген компонентом, например, scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, обеспечивающую увеличенную способность клетки отвечать после связывания антигена, по сравнению с отсутствием спейсера.

[0345] В некоторых примерах, спейсер составляет или составляет приблизительно 12 аминокислот в длину, или составляет не более чем 12 аминокислот в длину. Иллюстративные спейсеры включают спейсеры, имеющие 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 включает любое целое число между конечными точками любого из перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления, область спейсера имеет приблизительно 12 аминокислот или менее, приблизительно 119 аминокислот или менее, или приблизительно 229 аминокислот или менее. Иллюстративные спейсеры включают шарнир IgG4 отдельно, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и C_H3, или шарнир IgG4, связанный с доменом C_H3. Иллюстративные спейсеры включают, но без ограничения, спейсеры, описанные в Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, Hudecek et al. (2015) Cancer Immunol Res. 3(2): 125-135 или Публикации международной патентной заявки No. WO2014031687, Патенте США No. 8822647 или US2014/0271635. В некоторых вариантах осуществления, спейсер включает последовательность шарнирной области иммуноглобулина, область C_H2 и C_H3. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько из шарнира, C_H2 и C_H3, происходят, полностью или частично, из IgG4 или IgG2. В некоторых случаях, шарнир, C_H2 и C_H3 происходят из IgG4. В некоторых аспектах, один или несколько из шарнира, C_H2 и C_H3 являются химерными и содержат последовательность, происходящую из IgG4 и IgG2. В некоторых примерах, спейсер содержит химерный шарнир IgG4/2, область C_H2 IgG2/4 и IgG4 C_H3.

[0346] В некоторых вариантах осуществления, спейсер может происходить, полностью или частично, из IgG4 и/или IgG2. В некоторых вариантах осуществления, спейсер может представлять собой химерный полипептид, содержащий одно или несколько из шарнира, последовательности(последовательностей) C_H2 и/или C_H3, происходящих из IgG4, IgG2 и/или IgG2, и IgG4. В некоторых вариантах осуществления,

спейсер может содержать мутации, такие как одна или несколько одиночных аминокислотных мутаций в одном или нескольких доменах. В некоторых примерах, модификация аминокислоты представляет собой замену пролином (P) серина (S) в шарнирной области IgG4. В некоторых вариантах осуществления, модификация аминокислоты представляет собой замену глутамином (Q) аспарагина (N) для уменьшения гетерогенности гликозилирования, такую как замена N на Q в положении, соответствующем положению 177 в области последовательности C_H2 константной области тяжелой цепи IgG4, указанной в SEQ ID NO: 70 (No. доступа в Uniprot P01861; положение, соответствующее положению 297 по нумерации EU и положение 79 последовательности шарнир-C_H2-C_H3 спейсер, указанной в SEQ ID NO:4) или замена N на Q в положении, соответствующем положению 176 в последовательности C_H2 области константной области тяжелой цепи IgG2, указанную в SEQ ID NO: 71 (No. доступа в Uniprot P01859; положение, соответствующее положению 297 по нумерации EU).

[0347] В некоторых аспектах, спейсер содержит только шарнирную область IgG, например, только шарнир из IgG4 или IgG1, например, спейсер только из шарнира, указанный в SEQ ID NO:1, и кодирован последовательностью, указанную в SEQ ID NO: 2. В других вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и/или C_H3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и C_H3, такой как указано в SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный только с доменом C_H3, такой как указано в SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой или содержит богатую глицином-серином последовательность или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры. В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть происходит из IgD. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере точно или приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4 и 5.

[0348] Узнающий антиген домен, как правило, является связанным с одним или несколькими компонентами для передачи внутриклеточных сигналов, такими как передающие сигналы компоненты, имитирующие активацию через комплекс рецептора антигена, такой как комплекс TCR, в случае CAR, и/или передачу сигнала посредством другого рецептора поверхности клетки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий компонент (например, антитело) является связанным с одним или несколькими трансмембранными и внутриклеточными передающими сигнала областями. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен слит с внеклеточным доменом. В одном варианте

осуществления, используют трансмембранный домен, естественным образом ассоциированный с одним из доменов в рецепторе, например, CAR. В некоторых случаях, трансмембранный домен отбирают или модифицируют посредством аминокислотной замены, для исключения связывания таких доменов с трансмембранными доменами одинаковых или различных поверхностных мембранных белков для минимизации взаимодействий с другими членами комплекса рецептора.

[0349] Трансмембранный домен, в некоторых вариантах осуществления, происходит либо из природного, либо из синтетического источника. Когда источник является природным, домен, в некоторых аспектах, происходит из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, происходящие из (т.е., содержащие по меньшей мере трансмембранную область(области) из) цепи альфа, бета или дзета Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Альтернативно, трансмембранный домен, в некоторых вариантах осуществления, является синтетическим. В некоторых аспектах, синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах, триплет из фенилаланина, триптофана и валина можно обнаружить на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, связывание осуществляют посредством линкеров, спейсеров и/или трансмембранного домена(доменов).

[0350] Среди внутриклеточных доменов передачи сигналов присутствуют домены, имитирующие или приблизительно воспроизводящие сигнал через природный рецептор антигена, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором и/или сигнал через костимулирующий рецептор отдельно. В некоторых вариантах осуществления, короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной между 2 и 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий остатки глицина и серина, например, дуплет глицин-серин, присутствует и формирует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим передающим сигналами доменом CAR.

[0351] Рецептор, например, CAR, как правило, включает по меньшей мере один внутриклеточный передающий сигналы компонент или компоненты. В некоторых вариантах осуществления, рецептор включает внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как цепь CD3 TCR, опосредующая активацию Т-клетки и цитотоксичность, например, цепь CD3-дзета. Таким образом, в некоторых аспектах, связывающее ROR1 антитело является связанным с одним или несколькими модулями передачи сигналов клеткам. В некоторых вариантах осуществления, модули передачи сигналов включают трансмембранный домен CD3, внутриклеточные передающие сигналы домены CD3 и/или другие трансмембранные домены CD. В некоторых 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 некоторых

аспектах, CAR включает химерную молекулу между CD3-дзета (CD3- ζ) или рецептором Fc γ и CD8, CD4, CD25 или CD16.

[0352] В некоторых вариантах осуществления, при связывании CAR, цитоплазматический домен или внутриклеточная передающая сигналы область CAR активирует по меньшей мере одно из нормальных эффекторных функций или ответов иммуноцита, например, Т-клетки, модифицированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых контекстах, CAR индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическая активность или активность Т-клетки-помощника, например, секрецию цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления, укороченную часть внутриклеточной передающей сигналы области компонента рецептора антигена или костимулирующей молекулы используют вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если она передает сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные передающие сигналы области, например, содержащие внутриклеточный домен или домены, включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), и в некоторых аспектах, также цитоплазматические последовательности корецепторов, которые в природном контексте действуют во взаимодействии с таким рецептором для инициации передачи сигналов после привлечения рецептора антигена, и/или любое производное или вариант таких молекул, и/или любую синтетическую последовательность, имеющую некоторую функциональную способность.

[0353] В контексте природного TCR, полная активация, как правило, требует не только передачи сигналов через TCR, но также костимулирующего сигнала. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, для стимуляции полной активации, компонент для образования вторичного или костимулирующего сигнала также включают в CAR. В других вариантах осуществления, CAR не включает компонент для образования костимулирующего сигнала. В некоторых аспектах, дополнительный CAR является экспрессированным на той же клетке и обеспечивает компонент для образования вторичного или костимулирующего сигнала.

[0354] Активацию Т-клетки в некоторых аспектах описывают как опосредованную двумя классами цитоплазматических последовательностей для передачи сигналов: последовательностями, иницирующими зависимую от антигена первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические передающие сигналы последовательности), и последовательностями, которые действуют независимым от антигена образом для образования вторичного или костимулирующего сигнала (вторичные цитоплазматические передающие сигналы последовательности). В некоторых аспектах, CAR включает один или оба из таких передающих сигналы компонентов.

[0355] В некоторых аспектах, CAR включает первичную цитоплазматическую передающую сигналы последовательность, которая регулирует первичную активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические передающие сигналы последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать мотивы передачи сигналов, известные как иммунорецепторные тирозиновые

активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические передающие сигналы последовательности, включают ITAM, происходящие из TCR или CD3-дзета, FcR-гамма или FcR-бета. В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматические молекула(молекулы) передачи сигналов в CAR содержит(содержат) цитоплазматический передающий сигналы домен, его часть, или последовательность, происходящую из CD3-дзета.

[0356] В некоторых вариантах осуществления, CAR включает передающую сигналы область и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такого как CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 и ICOS. В некоторых аспектах, один и тот же CAR включает как передающую сигналы область, так и костимулирующие компоненты.

[0357] В некоторых вариантах осуществления, передающая сигналы область включена в один CAR, в то время как костимулирующий компонент предоставлен другим CAR, узнающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления, CAR включают активирующие или стимулирующие CAR, и костимулирующие CAR, оба экспрессированные на одной и той же клетке (см. WO2014/055668).

[0358] В конкретных вариантах осуществления, внутриклеточная передающая сигналы область содержит трансмембранный и передающий сигналы домен CD28, связанный с внутриклеточным доменом CD3 (например, CD3-дзета). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная передающая сигналы область содержит химерные из CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9) костимулирующие домены, связанные с внутриклеточным доменом CD3-дзета.

[0359] В некоторых вариантах осуществления, CAR включает один или несколько, например, два или более, костимулирующих доменов и активирующий домен, например, первичный активирующий домен, в цитоплазматической части. Иллюстративные CAR включают внутриклеточные компоненты CD3-дзета, CD28 и 4-1BB.

[0360] В некоторых случаях, CAR обозначают как CAR первого, второго и/или третьего поколения. В некоторых аспектах, CAR первого поколения представляет собой CAR, обеспечивающий единственно индуцированный CD3-цепью сигнал после связывания антигена; в некоторых аспектах, CAR второго поколения представляет собой CAR, обеспечивающий такой сигнал и костимулирующий сигнал, такой как CAR, включающий внутриклеточный передающий сигналы домен из костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах, CAR третьего поколения представляет собой CAR, включающий множество костимулирующих доменов из различных костимулирующих рецепторов.

[0361] В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, описанные в настоящем описании. В некоторых аспектах, химерный рецептор антигена включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, описанные в настоящем описании, и внутриклеточный передающий сигналы домен. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент включает scFv или однодоменное антитело V_H, и

внутриклеточный домен содержит ITAM. В некоторых аспектах, внутриклеточный передающий сигналы домен включает передающий сигналы домен дзета-цепи из дзета-цепи CD3 (CD3 ζ). В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена включает трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной передающей сигналы областью.

[0362] В некоторых аспектах, трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. Внеклеточный и трансмембранный домен могут быть связаны напрямую или опосредованно. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный и трансмембранный домен связаны посредством спейсера, такого как любой из описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена содержит внутриклеточный домен из костимулирующей молекулы Т-клетки, например, между трансмембранным доменом и внутриклеточным передающим сигналы доменом. В некоторых аспектах, костимулирующая молекула Т-клетки представляет собой CD28 или 4-1BB.

[0363] В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий передающую сигналы часть CD28 или ее функциональный вариант и передающую сигналы часть CD3 дзета или ее функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий передающую сигналы часть 4-1BB или ее функциональный вариант, и передающую сигналы часть CD3-дзета или ее функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления, рецептор дополнительно включает спейсер, содержащий часть молекулы Ig, например, молекулы Ig человека, такую как шарнир Ig, например, шарнир IgG4, например, содержащий только шарнир спейсер.

[0364] В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен рецептора, например, CAR, представляет собой трансмембранный домен CD28 человека или его вариант, например, 27-аминокислотный трансмембранный домен CD28 человека (No. доступа: P10747.1), или представляет собой трансмембранный домен, который содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, имеющую по меньшей мере точно или приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO:8; в некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен, содержащий часть рекомбинантного рецептора, содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9 или последовательность аминокислот, имеющую по меньшей мере точно или приблизительно 85%, 86%, 87%,

88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ней.

[0365] В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена содержит внутриклеточный домен из костимулирующей молекулы Т-клетки. В некоторых аспектах, костимулирующая молекула Т-клетки представляет собой CD28 или 4-1BB.

[0366] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная передающая сигналы область содержит внутриклеточный костимулирующий передающий сигналы домен CD28 человека или его функциональный вариант или часть, такой как его 41-аминокислотный домен и/или такой домен с заменой LL на GG в положениях 186-187 природного белка CD28. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен может содержать последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 10 или 11, или последовательность аминокислот, имеющую по меньшей мере точно или приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная область содержит внутриклеточный костимулирующий передающий сигналы домен 4-1BB или его функциональный вариант или часть, такой как 42-аминокислотный цитоплазматический домен 4-1BB человека (No. доступа Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, такой как последовательность аминокислот, указанная в SEQ ID NO: 12, или последовательность аминокислот, имеющая по меньшей мере точно или приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

[0367] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная передающая сигналы область содержит цепь CD3 человека, необязательно, стимулирующий передающий сигналы домен CD3-дзета или его функциональный вариант, такой как 112 ак цитоплазматический домен изоформы 3 CD3 ζ человека (No. доступа: P20963.2) или передающий сигналы домен CD3-дзета, как описано в Патенте США No.: 7446190 или Патенте США No. 8911993. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная передающая сигналы область содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или последовательность аминокислот, имеющую по меньшей мере точно или приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13, 14 или 15.

[0368] В некоторых аспектах, спейсер содержит только шарнирную область IgG, например, только шарнир IgG4 или IgG1, такой 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 некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и C_H3, такой как указано в SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например,

шарнир IgG4, связанный только с доменом C_H3, такой как указано в SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой или содержит богатую глицином-серином последовательность или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры.

2. Т-клеточные рецепторы (TCR)

[0369] В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающую часть, узнающие пептидный эпитоп или Т-клеточный эпитоп полипептида-мишени, такого как антиген опухоли, вирусный или аутоиммунный белок.

[0370] В некоторых 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 фрагменты, и которая является способной специфически связывать пептид, связанный с молекулой МНС. В некоторых вариантах осуществления, TCR находится в форме $\alpha\beta$. Как правило, TCR, существующие в формах $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$, как правило, являются в общем структурно сходными, но экспрессирующие их Т-клетки могут иметь отличные анатомические локализации или функции. TCR можно обнаруживать на поверхности клетки или в растворимой форме. Как правило, TCR обнаруживают на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он, как правило, является ответственным за узнавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС).

[0371] Если не указано иное, термин «TCR» следует понимать как включающий полноразмерные TCR, так же как их антигенсвязывающие части или антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой интактный или полноразмерный TCR, включая TCR в форме $\alpha\beta$ или в форме $\gamma\delta$. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой антигенсвязывающую часть, которая меньше полноразмерного TCR, но которая связывается со специфическим пептидом, связанным с молекулой МНС, например, связывается с комплексом МНС-пептид. В некоторых случаях, антигенсвязывающая часть или фрагмент TCR могут содержать только часть структурных доменов полноразмерного или интактного TCR, но все еще являются способными связывать пептидный эпитоп, такой как комплекс МНС-пептид, с которым связывается полноразмерный TCR. В некоторых случаях, антигенсвязывающая часть содержит переменные домены TCR, такие как переменная α -цепь и переменная β -цепь TCR, достаточные для формирования участка связывания для связывания со специфическим комплексом МНС-пептид. Как правило, переменные цепи TCR содержат определяющие комплементарность области, вовлеченные в узнавание пептида, МНС и/или комплекса МНС-пептид.

[0372] В некоторых вариантах осуществления, переменные домены TCR содержат гиперпеременные петли, или определяющие комплементарность области (CDR), которые, как правило, вносят первичный вклад в способность и специфичность

узнавания и связывания антигена. В некоторых вариантах осуществления, CDR из TCR или их комбинация формирует весь или по существу весь антигенсвязывающий участок данной молекулы TCR. Различные CDR в варибельной области TCR, как правило, разделены каркасными областями (FR), которые, как правило, имеют меньшую изменчивость среди молекул TCR, по сравнению с CDR (см., например, Jores et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 87:9138, 1990; Chothia et al., *EMBO J.* 7:3745, 1988; см. также Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.* 27:55, 2003). В некоторых вариантах осуществления, CDR3 является главной CDR, ответственной за связывание с антигеном или специфичность, или является наиболее важной среди трех CDR в данной варибельной области TCR для узнавания антигена, и/или для взаимодействия с частью процессированного пептида комплекса пептид-МНС. В некоторых контекстах, CDR1 альфа-цепи может взаимодействовать с N-концевой частью определенных антигенных пептидов. В некоторых контекстах, CDR1 бета-цепи может взаимодействовать с C-концевой частью пептида. В некоторых контекстах, CDR2 оказывает наиболее сильное влияние или является первичной CDR, ответственной за взаимодействие с частью МНС или узнавание части МНС из комплекса МНС-пептид. В некоторых вариантах осуществления, варибельная область β -цепи может содержать дополнительную гиперварибельную область (CDR4 или HVR4), которая, как правило, вовлечена в связывание суперантигена, а не в узнавание антигена (Kotb (1995) *Clinical Microbiology Reviews*, 8:411-426).

[0373] В некоторых вариантах осуществления, TCR может также содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический хвост (см., например, Janeway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). В некоторых аспектах, каждая цепь TCR может иметь один N-концевой варибельный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост на C-конце. В некоторых вариантах осуществления, TCR ассоциирован с инвариантами белками из комплекса CD3, вовлеченными в опосредование передачи сигнала.

[0374] В некоторых вариантах осуществления, цепь TCR содержит один или несколько константных доменов. Например, внеклеточная часть данной цепи TCR (например, α -цепь или β -цепь) может содержать два иммуноглобулиноподобных домена, таких как варибельный домен (например, V α или V β ; как правило, аминокислоты 1-116, на основании нумерации Kabat, Kabat et al., «Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.), и константный домен (например, константный домен α -цепи или C α , как правило, положения 117-259 цепи на основании нумерации Kabat или константный домен β цепи, или C β , как правило, положения 117-295 цепи на основании Kabat), прилежащий к клеточной мембране. Например, в некоторых случаях, внеклеточная часть TCR, сформированная двумя цепями, содержит два ближайших к мембране константных

домена и два отдаленных от мембраны переменных домена, где каждый из 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 некоторых вариантах осуществления, TCR может иметь дополнительный остаток цистеина на каждой из α и β цепей, так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

[0375] В некоторых вариантах осуществления, цепи TCR содержат трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен является положительно заряженным. В некоторых случаях, цепь TCR содержит цитоплазматический хвост. В некоторых случаях, структура позволяет TCR вступать в ассоциацию с другими молекулами, подобными CD3 и его субъединицам. Например, TCR, содержащий константные домены с трансмембранной областью, может закоривать белок в мембране клетки и вступать в ассоциацию с инвариантными субъединицами аппарата или комплекса передачи сигналов CD3. Внутриклеточные хвосты передающих сигналы субъединиц CD3 (например, цепей CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 ζ) содержат один или несколько иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов или ITAM, которые вовлечены в способность комплекса TCR передавать сигналы.

[0376] В некоторых 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 некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (цепи α и β или цепи γ и δ), которые являются связанными, например, посредством дисульфидной связи или дисульфидных связей.

[0377] В некоторых вариантах осуществления, TCR можно получать из известной последовательности(последовательностей) TCR, таких как последовательности цепей V α , β , для которых по существу полноразмерная кодирующая последовательность является легко доступной. Способы получения полноразмерных последовательностей TCR, включая последовательности V-цепи, из клеточных источников, хорошо известны. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, можно получать из множества источников, например, посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплификации кодирующих TCR нуклеиновых кислот внутри или после выделения из данной клетки или клеток, или синтеза публично доступных последовательностей ДНК TCR.

[0378] В некоторых вариантах осуществления, TCR получают из биологического источника, например, из клеток, например, из Т-клетки (например, цитотоксической Т-клетки), Т-клеточной гибридомы или другого публично доступного источника. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки можно получать из выделенных *in vivo* клеток. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой прошедший отбор в тимусе TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой рестрицированный по неоэпитопу TCR. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки

могут представлять собой культивированные гибридомы или клон Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающую часть или его антигенсвязывающий фрагмент можно получать синтетически, зная последовательность TCR.

[0379] В некоторых вариантах осуществления, TCR получают из TCR, идентифицированного или отобранного при скрининге библиотеки TCR-кандидатов против полипептидного антигена-мишени, или Т-клеточного эпитопа-мишени из него. Библиотеки TCR можно получать посредством амплификации репертуара V α и V β из Т-клеток, выделенных от субъекта, включая клетки, присутствующие в РВМС, селезенке или другом лимфоидном органе. В некоторых случаях, Т-клетки можно амплифицировать из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). В некоторых вариантах осуществления, библиотеки TCR можно получать из CD4+ или CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, TCR можно амплифицировать из Т-клеточного источника от нормального или здорового субъекта, т.е. библиотеки нормальных TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR можно амплифицировать из Т-клеточного источника от пораженного заболеванием субъекта, т.е. библиотеки ассоциированных с заболеванием TCR. В некоторых вариантах осуществления, вырожденные праймеры используют для амплификации репертуара генов V α и V β , например, посредством RT-ПЦР, в образцах, таких как Т-клетки, полученные от людей. В некоторых вариантах осуществления, библиотеки scTv можно собирать из библиотек наивных V α и V β , в которых амплифицированные продукты клонируют или собирают, с разделением посредством линкера. В зависимости от источника субъекта и клеток, библиотеки могут являться специфическими для аллеля HLA. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, библиотеки TCR можно получать посредством мутагенеза или внесения разнообразия в исходной или каркасной молекулы TCR. В некоторых аспектах, TCR подвергают направленной эволюции, например, посредством мутагенеза, например, цепи α или β . В некоторых аспектах, конкретные остатки в пределах CDR TCR изменяют. В некоторых вариантах осуществления, отобранные TCR можно модифицировать посредством аффинного созревания. В некоторых вариантах осуществления, можно отбирать антигенспецифические Т-клетки, например, посредством скрининга для оценки активности CTL против пептида. В некоторых аспектах, можно отбирать TCR, например, присутствующие на антигенспецифических Т-клетках, например, по активности связывания, например, конкретной аффинности или авидности для антигена.

[0380] В некоторых вариантах осуществления, генетически модифицированные рецепторы антигенов включают рекомбинантные Т-клеточные рецепторы (TCR) и/или TCR, клонированные из природных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, высокоаффинный клон Т-клеток для антигена-мишени (например, антигена злокачественной опухоли) идентифицируют, выделяют от пациента и вводят в клетки. В некоторых вариантах осуществления, клон TCR для антигена-мишени получают в трансгенных мышах, сконструированных с использованием генов иммунной системы

человека (например, системы человеческих лейкоцитарных антигенов, или HLA). См., например, антигены опухолей (см., например, Parkhurst et al. (2009) *Clin Cancer Res.* 15:169-180 и Cohen et al. (2005) *J Immunol.* 175:5799-5808. В некоторых вариантах осуществления, фаговый дисплей используют для выделения TCR против антигена-мишени (см., например, Varela-Rohena et al. (2008) *Nat Med.* 14:1390-1395 и Li (2005) *Nat Biotechnol.* 23:349-354.

[0381] В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающая часть являются модифицированными или сконструированными. В некоторых вариантах осуществления, способы направленной эволюции используют для получения TCR с измененными свойствами, например, с более высокой аффинностью для специфического комплекса МНС-пептид. В некоторых вариантах осуществления, направленную эволюцию осуществляют способами дисплея, включая, но без ограничения, дрожжевой дисплей (Holler et al. (2003) *Nat Immunol.* 4, 55-62; Holler et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 5387-92), фаговый дисплей (Li et al. (2005) *Nat Biotechnol.* 23, 349-54), или Т-клеточный дисплей (Chervin et al. (2008) *J Immunol Methods.* 339, 175-84). В некоторых вариантах осуществления, способы дисплея включают конструирование или модификацию известного, исходного или эталонного TCR. Например, в некоторых случаях, TCR дикого типа можно использовать в качестве матрицы для получения подвергнутых мутагенезу TCR, в которых один или несколько остатков CDR мутированы, и отбирают мутанты с желательным измененным свойством, таким как более высокая аффинность для желательного антигена-мишени.

[0382] В некоторых вариантах осуществления, пептиды полипептида-мишени для использования для продукции или получения представляющих интерес TCR известны или могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области. В некоторых вариантах осуществления, пептиды, пригодные для использования для получения TCR или антигенсвязывающих частей, можно определять на основании присутствия рестрицированного по HLA мотива в представляющем интерес полипептиде-мишени, таком как полипептид-мишень, описанный ниже. В некоторых вариантах осуществления, пептиды идентифицируют с использованием компьютерных прогностических моделей. В некоторых вариантах осуществления, для прогнозирования участков связывания МНС класса I, такие модели включают, но без ограничения, ProPred1 (Singh and Raghava (2001) *Bioinformatics* 17(12):1236-1237, и SYFPEITHI (см. Schuler et al. (2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 409(1): 75-93 2007). В некоторых вариантах осуществления, рестрицированный по МНС эпитоп представляет собой HLA-A0201, который является экспрессированным приблизительно у 39-46% из всех европеоидов и таким образом, представляет собой подходящий выбор антигена МНС для использования для получения TCR или другой связывающей МНС-пептид молекулы.

[0383] Мотивы, связывающие HLA-A0201, и участки расщепления для протеасом и иммунопротеасом, с использованием компьютерных прогностических моделей, известны. Для прогнозирования участков связывания МНС класса I, такие модели включают, но без

ограничения, ProPred1 (описанную более подробно 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).

[0384] В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающая часть может представлять собой полученный рекомбинантным способом природный белок или его мутантную форму, в которой изменены одно или несколько свойств, таких как характеристики связывания. В некоторых вариантах осуществления, TCR может происходить из одного из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса или другое млекопитающее. TCR может находиться в связанной с клеткой или в растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления, для целей представленных способов, TCR находится в связанной с клеткой форме, экспрессированной на поверхности клетки.

[0385] В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой полноразмерный TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой димерный TCR (dTCR). В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой одноцепочечный TCR (sc-TCR). В некоторых вариантах осуществления, dTCR или scTCR имеют структуры, как описано в WO 03/020763, WO 04/033685, WO2011/044186.

[0386] В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит последовательность, соответствующую трансмембранной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит последовательность, соответствующую цитоплазматической последовательности. В некоторых вариантах осуществления, TCR является способным формировать комплекс TCR с CD3. В некоторых вариантах осуществления, любые из TCR, включая dTCR или scTCR, могут быть связаны с передающими сигналами доменами, что приводит к образованию активного TCR на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, TCR является экспрессированным на поверхности клеток.

[0387] В некоторых вариантах осуществления dTCR содержит первый полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области α -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области α -цепи TCR, и второй полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области β -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области β -цепи TCR, где первый и второй полипептиды связаны посредством дисульфидной связи. В некоторых вариантах осуществления, связь может соответствовать природной межцепевой дисульфидной связи, присутствующей в природных димерных TCR $\alpha\beta$. В некоторых вариантах осуществления, межцепевые дисульфидные связи не присутствуют в природном TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько остатков цистеина можно включать в

внечелочные последовательности константной области пары полипептидов dTCR. В некоторых случаях, как природная, так и неприродная дисульфидная связь может являться желательной. В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит трансмембранную последовательность для закоривания в мембране.

[0388] В некоторых вариантах осуществления, dTCR содержит α -цепь TCR, содержащую переменный домен α , константный домен α и первый мотив для димеризации, присоединенный к С-концу константного домена α , и β -цепь TCR, содержащую переменный домен β , константный домен β и первый мотив для димеризации, присоединенный к С-концу константного домена β , где первый и второй мотивы для димеризации легко взаимодействуют с образованием ковалентной связи между аминокислотой в первом мотиве для димеризации и аминокислотой во втором мотиве для димеризации, связывая вместе α -цепь TCR и β -цепь TCR.

[0389] В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой scTCR. Как правило, scTCR можно получать с использованием известных способов, 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); Публикации международных PCT No. WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; и Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит введенную неприродную дисульфидную межцепьевую связь для облегчения ассоциации цепей TCR (см., например, Публикацию международной PCT No. WO 03/020763). В некоторых вариантах осуществления, scTCR представляет собой не связанный дисульфидной связью укороченный TCR, в котором гетерологичные лейциновые молнии, слитые с его С-концами, облегчают ассоциацию цепей (см., например, Публикацию международной PCT No. WO99/60120). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит переменный домен TCR α , ковалентно связанный с переменным доменом TCR β посредством пептидного линкера (см., например, Публикацию международной PCT No. WO99/18129).

[0390] В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый фрагмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей переменной области α -цепи TCR, второй фрагмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей последовательности переменной области β -цепи TCR, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константного домена β -цепи TCR, и линкерную последовательность, связывающую С-конец первого фрагмента с N-концом второго фрагмента.

[0391] В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый фрагмент, состоящий из последовательности переменной области α -цепи, слитой с N-концом внеклеточной последовательности константного домена α -цепи, и второй фрагмент, состоящий из последовательности переменной области β -цепи, слитой с N-концом последовательности внеклеточной константной и трансмембранной последовательности

β -цепи, и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую С-конец первого фрагмента с N-концом второго фрагмента.

[0392] В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый фрагмент, состоящий из последовательности вариабельной области β -цепи TCR, слитой с N-концом внеклеточной последовательности константного домена β -цепи, и второй фрагмент, состоящий из последовательности вариабельной области α -цепи, слитой с N-концом последовательности внеклеточной константной и трансмембранной последовательности α -цепи, и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую С-конец первого фрагмента с N-концом второго фрагмента.

[0393] В некоторых вариантах осуществления, линкер из scTCR, связывающий первый и второй фрагменты TCR, может представлять собой любой линкер, способный формировать одиночную полипептидную цепь, с сохранением в то же время специфичности связывания TCR. В некоторых вариантах осуществления, линкерная последовательность может, например, иметь формулу -P-AA-P-, где P представляет собой пролин, и AA представляет собой аминокислотную последовательность, где аминокислоты представляют собой глицин и серин. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй фрагменты образуют пару таким образом, что последовательности их вариабельных областей ориентированы для такого связывания. Таким образом, в некоторых случаях, линкер имеет достаточную длину для перекрывания расстояния между С-концом первого фрагмента и N-концом второго фрагмента, или наоборот, но является не слишком длинным для блокирования или уменьшения связывания scTCR с его лигандом-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, линкер может содержать от точно или приблизительно 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 некоторых вариантах осуществления, линкер имеет формулу -PGGG-(SGGGG)₅-P-, где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин, и S представляет собой серин (SEQ ID NO:22). В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет последовательность GSADDAKKDAKKDGKS (SEQ ID NO:23)

[0394] В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, связывающую остаток из иммуноглобулиновой области константного домена α -цепи с остатком из иммуноглобулиновой области константного домена β -цепи. В некоторых вариантах осуществления, межцепьевая дисульфидная связь в природном TCR не присутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько остатков цистеина можно включать в внеклеточные последовательности константной области первого и второго фрагментов полипептида scTCR. В некоторых случаях, как природная, так и неприродная дисульфидная связь может являться желательной.

[0395] В некоторых вариантах осуществления dTCR или scTCR, содержащего введенные межцепьевые дисульфидные связи, природные дисульфидные связи не присутствуют. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько из природных

остатков цистеина, формирующих природные межцепьевые дисульфидные связи, заменены на другой остаток, например, на серин или аланин. В некоторых вариантах осуществления, введенная дисульфидная связь может быть сформирована посредством мутагенеза не относящихся к цистеину остатков в первом и втором фрагментах до цистеина. Иллюстративные неприродные дисульфидные связи TCR описаны в Публикации международной PCT No. WO2006/000830.

[0396] В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающий фрагмент имеет аффинность с равновесной константой связывания для антигена-мишени между или между приблизительно 10^{-5} и 10^{-12} М, и всеми ее индивидуальными значениями и диапазонами. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой комплекс МНС-пептид или лиганд.

[0397] В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, например, цепи α и β , можно амплифицировать посредством ПЦР, клонирования или других пригодных способов и клонировать в пригодные экспрессирующие вектор или векторы. Экспрессирующий вектор может представлять собой любой пригодный рекомбинантный экспрессирующий вектор, и может быть использован для трансформации или трансфекции любого пригодного хозяина. Пригодные векторы включают векторы, разработанные для размножения и распространения или для экспрессии, или для того и другого, например, плазмиды и вирусы.

[0398] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные экспрессирующие векторы можно получать с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные экспрессирующие векторы можно получать с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК. В некоторых вариантах осуществления, вектор может содержать неприродный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей TCR или ее антигенсвязывающую часть (или другую связывающую МНС-пептид молекулу). В некоторых вариантах осуществления, промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, такой как промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор, обнаруженный в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мыши. Предусмотрены также другие известные промоторы.

[0399] В некоторых вариантах осуществления, после получения клона Т-клетки, цепи TCR альфа и бета выделяют и клонируют в вектор для экспрессии генов. В некоторых вариантах осуществления, гены TCR альфа и бета связаны посредством пептида проскальзывания рибосомы 2А пикорнавируса, так что обе цепи экспрессируются совместно. В некоторых вариантах осуществления, генетический перенос TCR осуществляют 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.

[0400] В некоторых вариантах осуществления, для получения вектора, кодирующего TCR, цепи α и β амплифицируют посредством ПЦР из тотальной кДНК, выделенной из клона Т-клеток, экспрессирующих представляющий интерес TCR, и клонируют в экспрессирующий вектор. В некоторых вариантах осуществления, цепи α и β клонируют в один и тот же вектор. В некоторых вариантах осуществления, цепи α и β клонируют в различные векторы. В некоторых вариантах осуществления, полученные цепи α и β вставляют в ретровирусный, например, лентивирусный, вектор.

3. Химерный рецептор аутоантител (CAAR)

[0401] В некоторых вариантах осуществления, кодированный рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор аутоантител (CAAR). В некоторых вариантах осуществления, CAAR является специфическим для аутоантитела. В некоторых вариантах осуществления, клетку, экспрессирующую CAAR, такую как Т-клетка, модифицированная для экспрессии CAAR, можно использовать для специфического связывания и уничтожения экспрессирующих аутоантитело клеток, но не экспрессирующих нормальное антитело клеток. В некоторых вариантах осуществления, экспрессирующие CAAR клетки можно использовать для лечения аутоиммунного заболевания, ассоциированного с экспрессией собственных антигенов, такого как аутоиммунные заболевания. В некоторых вариантах осуществления, экспрессирующие CAAR клетки могут быть нацелены на В-клетки, которые в конечном счете продуцируют аутоантитела и экспонируют аутоантитела на своих клеточных поверхностях, помечая эти В-клетки в качестве специфических для заболевания мишеней для терапевтического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления, экспрессирующие CAAR клетки можно использовать для эффективного нацеливания и уничтожения патогенных В-клеток при аутоиммунных заболеваниях посредством нацеливания на вызывающие заболевание В-клетки с использованием антигенспецифического химерного рецептора аутоантител. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой CAAR, такой как любой из описанных в Публикации патентной заявки США No. US 2017/0051035.

[0402] В некоторых вариантах осуществления, CAAR содержит связывающий аутоантитело домен, трансмембранный домен и внутриклеточную передающую сигналы область. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточную передающую сигналы область содержит внутриклеточный передающий сигналы домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен представляет собой или содержит передающий первичные сигналы домен, передающий сигналы домен, способный индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, передающий сигналы домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или передающий сигналы домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная передающая сигналы область

содержит передающую вторичные или костимулирующие сигналы область (передающие вторичные внутриклеточные сигналы области).

[0403] В некоторых вариантах осуществления, связывающий аутоантитело домен содержит аутоантиген или его фрагмент. Выбор аутоантигена может зависеть от типа аутоантитела, подвергаемого нацеливанию. Например, аутоантиген может быть выбран, поскольку он узнает аутоантитело на клетке-мишени, такой как В-клетка, ассоциированная с конкретным участком заболевания, например, аутоиммунного заболевания, такого как опосредованное аутоантителами аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления, аутоиммунное заболевание включает обыкновенную пузырчатку (PV). Иллюстративные аутоантигены включают десмоглеин 1 (Dsg1) и Dsg3.

4. Множественное нацеливание

[0404] В некоторых вариантах осуществления, клетки и способы включены в стратегии множественного нацеливания, такие как экспрессия двух или более генетически модифицированных рецепторов на клетке, где каждый узнает одинаковый или различный антиген и как правило, каждый включает различный внутриклеточный передающий сигналы компонент. Такие способы множественного нацеливания описаны, например, в WO 2014055668 (описывающей комбинации активирующих и костимулирующих CAR, например, нацеленных на два различных антигена, присутствующих индивидуально на нецелевых, например, нормальных, клетках, но присутствующих совместно только на клетках, пораженных заболеванием или состоянием, подлежащим лечению) и Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (December, 2013) (описывающей клетки, экспрессирующие активирующий и ингибирующий CAR, такие как клетки, в которых активирующий CAR связывается с одним антигеном, экспрессированным как на нормальных или не пораженных заболеванием клетках, так и на клетках, пораженных заболеванием или состоянием, подлежащим лечению, и ингибирующий CAR связывается с другим антигеном, экспрессированным только на нормальных клетках или клетках, которые нежелательно подвергать лечению).

[0405] Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки включают рецептор, экспрессирующий первый генетически модифицированный рецептор антигена (например, CAR или TCR), который является способным индуцировать активирующий или стимулирующий сигнал для клетки, как правило, после специфического связывания с антигеном, узнаваемым первым рецептором, например, первым антигеном. В некоторых вариантах осуществления, клетка дополнительно включает второй генетически модифицированный рецептор антигена (например, CAR или TCR), например, химерный костимулирующий рецептор, который является способным индуцировать костимулирующий сигнал для иммунита, как правило, после специфического связывания с вторым антигеном, узнаваемым вторым рецептором. В некоторых вариантах осуществления, первый антиген и второй антиген являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления, первый антиген и второй антиген являются различными.

[0406] В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй генетически модифицированный рецептор антигена (например, CAR или TCR) является способным индуцировать активирующий сигнал для клетки. В некоторых вариантах осуществления, рецептор включает внутриклеточный передающий сигналы компонент, содержащий ITAM или подобный ITAM мотивы. В некоторых вариантах осуществления, активация, индуцированная первым рецептором, включает передачу сигнала или изменение экспрессии белка в клетке, приводящие к инициации иммунного ответа, такого как фосфорилирование ITAM, и/или к инициации каскада опосредованной ITAM передачи сигналов, к формированию иммунологического синапса и/или кластеризации молекулы около связанного рецептора (например, CD4 или CD8 и т.д.), активации одного или нескольких факторов транскрипции, таких как NF-κB и/или AP-1, и/или индукцию экспрессии генов таких факторов, как цитокины, пролиферация и/или выживаемость.

[0407] В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй рецептор включает внутриклеточные передающие сигналы домены костимулирующих рецепторов, таких как CD28, CD137 (4-1BB), OX40 и/или ICOS. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй рецептор включают внутриклеточные передающие сигналы домены костимулирующих рецепторов, которые являются различными. В одном варианте осуществления, первый рецептор содержит передающую костимулирующие сигналы область CD28, и второй рецептор содержит передающую костимулирующие сигналы область 4-1BB, или наоборот.

[0408] В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй рецептор включает как внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий ITAM или подобный ITAM мотивы, так и внутриклеточный передающий сигналы домен костимулирующего рецептора.

[0409] В некоторых вариантах осуществления, первый рецептор содержит внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий ITAM или подобный ITAM мотивы, и второй рецептор содержит внутриклеточный передающий сигналы домен костимулирующего рецептора. Костимулирующий сигнал в комбинации с активирующим или стимулирующим сигналом, индуцированные в одной и той же клетке, представляют собой то, что приводит к иммунному ответу, такому как надежный и длительный иммунный ответ, такой как увеличенная экспрессия генов, секреция цитокинов и другие факторы, и опосредованные Т-клеткой эффекторные функции, такие как уничтожение клеток.

[0410] В некоторых вариантах осуществления, ни связывание первого рецептора отдельно, ни связывание второго рецептора отдельно, не индуцирует надежный иммунный ответ. В некоторых аспектах, если только один рецептор является связанным, клетка приобретает толерантность или не отвечает на антиген, или подвергается ингибированию, и/или не подвергается индукции для пролиферации или секреции факторов, или выполнения эффекторных функций. В некоторых таких вариантах осуществления, однако, когда множество рецепторов являются связанными, например,

при встрече с клеткой, экспрессирующей первый и второй антигены, достигают желательного ответа, такого как полная иммунная активация или стимуляция, например, как показано посредством секреции одного или нескольких цитокинов, пролиферации, персистенции и/или выполнения иммуноэффекторной функции, такой как цитотоксическое уничтожение клетки-мишени.

[0411] В некоторых вариантах осуществления, два рецептора индуцируют, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал для клетки, таким образом, что связывание одного рецептора с его антигеном активирует клетку или индуцирует ответ, однако, связывание второго ингибирующего рецептора с его антигеном индуцирует сигнал, который супрессирует или ослабляет такой ответ. Примеры представляют собой комбинации активирующих CAR и ингибирующих CAR, или iCAR. Можно использовать, например, такой способ, в котором активирующий CAR связывается с антигеном, который экспрессируется при заболевании или состоянии, но который также экспрессируется на нормальных клетках, и ингибирующий рецептор связывается с отдельным антигеном, который экспрессируется на нормальных клетках, но не на пораженных заболеванием или состоянием клетках.

[0412] В некоторых вариантах осуществления, способ множественного нацеливания используют в случае, когда антиген, ассоциированный с конкретным заболеванием или состоянием, экспрессируется на не пораженной заболеванием клетке и/или экспрессируется на собственно модифицированной клетке, либо временно (например, при стимуляции в сочетании с генетической модификацией), либо постоянно. В таких случаях, посредством необходимости связывания двух отдельных и имеющих индивидуальную специфичность рецепторов антигенов, можно улучшать специфичность, избирательность и/или эффективность.

[0413] В некоторых вариантах осуществления, множество антигенов, например, первый и второй антигены, экспрессируются на клетке, ткани, или при заболевании или состоянии, подвергаемых нацеливанию, например, на клетке злокачественной опухоли. В некоторых аспектах, клетка, ткань, заболевание или состояние представляет собой множественную миелому или клетку множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько из множества антигенов, как правило, также экспрессируются на клетке, на которую нежелательно нацеливаться при клеточной терапии, такой как нормальная или не пораженная заболеванием клетка или ткань, и/или собственно модифицированные клетки. В таких вариантах осуществления, посредством необходимости связывания множества рецепторов для достижения ответа клетки, достигают специфичности и/или эффективности.

IV. СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ

[0414] В некоторых аспектах, модифицированные клетки, например, клетки, в которые интегрированы последовательности трансгена, можно использовать в сочетании со способом лечения, например, включающим введение любых модифицированных клеток или композиций, содержащих модифицированные клетки, оцененных с

использованием способов, представленных в настоящем описании. В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для тестирования, проверки, характеристики и/или оценки модифицированных клеток или композиций клеток до введения, например, для тестирования присутствия, отсутствия и/или количества интегрированных нуклеиновых кислот (например, последовательностей трансгена) в ходе одной или нескольких стадий способа модификации или получения, и/или для тестирования после составления, оценки для выпуска для введения и/или готовности для введения субъекту.

[0415] В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, или содержащие их композиции, оцененные или анализированные с использованием вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, можно использовать при множестве терапевтических, диагностических и профилактических применений. Например, модифицированные клетки или композиции, содержащие модифицированные клетки, можно использовать для лечения множества заболеваний и нарушений у субъекта. Способы и применения включают терапевтические способы и применения, например, включающие введение модифицированных клеток или содержащих их композиций, субъекту, имеющему заболевание, состояние или нарушение, такое как опухоль или злокачественная опухоль. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки или композиции, оцененные или анализированные с использованием вариантов, представленных в настоящем описании, вводят в эффективном количестве для осуществления лечения заболевания или нарушения. Применения включают применения модифицированных клеток или композиций в таких способах и видах лечения, и в получении лекарственного средства для осуществления таких терапевтических способов. В некоторых вариантах осуществления, способы, например, терапевтические способы, осуществляют посредством введения оцененных или анализированных модифицированных клеток, или содержащих их композиций, субъекту, имеющему, или как подозревают, имеющему заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления, этими способами, таким образом, лечат заболевание или состояние, или нарушение у субъекта.

[0416] В некоторых аспектах, модифицированные клетки или композицию модифицированных клеток можно вводить субъекту, такому как субъект, имеющий заболевание или нарушение. Способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут быть использованы в сочетании с представленными способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в Публикации патентной заявки США No. 2003/0170238 от Gruenberg et al; в Патенте США No. 4690915 to 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.

[0417] Заболевание или состояние, которое подвергают лечению, может представлять собой любое заболевание или состояние, при котором экспрессия антигена

ассоциирована с этиологией и/или вовлечена в этиологию заболевания, состояния или нарушения, например, вызывает, отягощает или иным образом вовлечена в такое заболевание, состояние или нарушение. Иллюстративные заболевания и состояния могут включать заболевания или состояния, ассоциированные с злокачественным развитием или трансформацией клеток (например, злокачественную опухоль), аутоиммунное или воспалительное заболевание, или инфекционное заболевание, например, вызванное бактериальным, вирусным или другим патогеном. Иллюстративные антигены, включающие антигены, ассоциированные с различными заболеваниями и состояниями, которые можно лечить, описаны выше. В конкретных вариантах осуществления, химерный рецептор антигена или трансгенный TCR специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием.

[0418] Среди заболеваний, состояний и нарушений присутствуют опухоли, включая солидные опухоли, гематологические злокачественные новообразования и меланомы, и включая локализованные и метастазирующие опухоли, инфекционные заболевания, такие как инфекция вирусом или другим патогеном, например, HIV, HCV, HBV, CMV, HPV, и паразитарное заболевание, и аутоиммунные и воспалительные заболевания. В некоторых вариантах осуществления, заболевание, нарушение или состояние представляет собой опухоль, злокачественную опухоль, злокачественное новообразование, неоплазию или другое пролиферативное заболевание или нарушение. Такие заболевания включают, но без ограничения, лейкоз, лимфому, например, острый миелоидный (или миелогенный) лейкоз (AML), хронический миелоидный (или миелогенный) лейкоз (CML), острый лимфоцитарный (или лимфобластный) лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточный лейкоз (HCL), мелколимфоцитарную лимфому (SLL), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, лимфому Беркитта, лимфому Ходжкина (HL), неходжкинскую лимфому (NHL), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL), фолликулярную лимфому, невосприимчивую фолликулярную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) и множественную миелому (MM). В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование, выбранное из числа острого лимфобластного лейкоза (ALL), ALL взрослых, хронического лимфобластного лейкоза (CLL), неходжжинской лимфомы (NHL) и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой NHL, и NHL выбрана из группы, состоящей из агрессивной NHL, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), NOS (новообразованной и трансформированной из индолентной), первичной медиастинальной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (PMBCL), богатой Т-клетками/гистиоцитами крупноклеточной В-клеточной лимфомы (TCHRBCL), лимфомы Беркитта, лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL) и/или фолликулярной лимфомы (FL), необязательно, фолликулярной лимфомы степени злокачественности 3В (FL3В).

[0419] В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой инфекционное заболевание или состояние, такое как, но без ограничения, вирусные, ретровирусные, бактериальные и протозойные инфекции, иммунодефицит, инфекции цитомегаловируса (CMV), вируса Эпштейна-Барр (EBV), аденовируса, полиомавируса ВК. В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание или состояние, такое как артрит, например, ревматоидный артрит (RA), диабет типа I, системная красная волчанка (SLE), воспалительное заболевание кишечника, псориаз, склеродермия, аутоиммунный тиреоидит, болезнь Грейва, болезнь Крона, рассеянный склероз, астма и/или заболевание или состояние, ассоциированное с трансплантацией.

[0420] В некоторых вариантах осуществления, антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, представляет собой или включает интегрин $\alpha\nu\beta 6$ (интегрин $\alpha\nu\beta 6$), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, раково/тестикулярный антиген 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, лиганд 1 хемокинов с мотивом C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, белок эпидермального фактора роста (EGFR), укороченный белок эпидермального фактора роста (tEGFR), рецептор эпидермального фактора роста с мутацией типа III (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин B2, рецептор эфрина A2 (EPHa2), рецептор эстрогена, подобный рецептору Fc белок 5 (FCRL5; также известный как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетальный рецептор ацетилхолина (фетальный AchR), связывающий фолат белок (FBP), рецептор-альфа фолата, ганглиозид GD2, О-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), сопряженный с G-белком рецептор, класса C, группы 5, член D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторную тирозинкиназу erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, ассоциированный с меланомой высокомолекулярный антиген человека (HMW-MAA), поверхностный антиген вируса гепатита В, человеческий лейкоцитарный антиген A1 (HLA-A1), человеческий лейкоцитарный антиген A2 (HLA-A2), рецептор альфа IL-22 (IL-22R α), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13R α 2), рецептор, содержащий домен вставки киназы (kdr), легкую цепь каппа, молекулу клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитоп CE7 из L1-CAM, член A семейства 8, содержащего богатые лейцином повторы (LRR8A), Lewis Y, ассоциированный с меланомой антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), с-Met, мышинный цитомегаловирус (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды члена D группы 2 естественных киллеров (NKG2D), мелан А (MART-1), молекулу адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетальный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простатспецифический антиген, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простатспецифический мембранный антиген (PSMA), подобный рецепторной

тирозинкиназе орфанный рецептор 1 (ROR1), сурвивин, гликопротеин трофобластов (TPBG также известный как 5T4), опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), родственный тирозиназе белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), родственный тирозиназе белок 2 (TRP2, также известный как допахром-тауомераза, допахром-дельта-изомераза или DCT) рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), антиген опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфический для патогена или экспрессируемого патогеном антиген, или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессированные HIV, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены, на которые нацелены рецепторы, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любой из ряда известных маркеров В-клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой или включает CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig каппа, Ig лямбда, CD79a, CD79b или CD30. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой или включает специфический для патогена или экспрессируемый патогеном антиген, такой как вирусный антиген (например, вирусный антиген из HIV, HCV, HBV), бактериальные антигены и/или паразитарные антигены.

[0421] В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv или домен V_H) специфически узнает антиген, такой как CD19. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент происходит из или представляет собой вариант антитела или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления, клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют посредством аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, подлежащего проведению клеточной терапии, или из образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах, клетки получают от субъекта, например, пациента, нуждающегося в лечении, и клетки, после выделения и переработки, вводят тому же самому субъекту.

[0422] В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления, В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой лейкоз или лимфому. В некоторых аспектах, заболевание или состояние представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ALL), ALL взрослых, хронический лимфобластный лейкоз (CLL), неходжскинскую лимфому (NHL) или диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL). В некоторых случаях, заболевание или состояние представляет собой NHL, например, или включая NHL, представляющую собой агрессивную NHL, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), NOS (новообразованную и трансформированную из индолентной), первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому (PMBCL), богатую Т-

клетками/гистиоцитами крупноклеточную В-клеточную лимфому (TCHRBCL), лимфому Беркитта, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL) и/или фолликулярную лимфому (FL), необязательно, фолликулярную лимфому степени злокачественности 3В (FL3В). В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием или экспрессированным в клетках из окружения очага, ассоциированного с В-клеточным злокачественным новообразованием. Антигены, на которые нацелены рецепторы, в некоторых вариантах осуществления, включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любой из ряда известных маркеров В-клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген, на который нацелен рецептор, представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig каппа, Ig лямбда, CD79a, CD79b или CD30, или их комбинации.

[0423] В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой миелому, такую как множественная миелома. В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, такой как CAR, специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием или экспрессированным в клетках из окружения очага, ассоциированного с множественной миеломой. Антигены, на которые нацелены рецепторы, в некоторых вариантах осуществления, включают антигены, ассоциированные с множественной миеломой. В некоторых аспектах, антиген, например, второй или дополнительный антиген, такой как специфический для заболевания антиген и/или родственный антиген, экспрессированы на множественной миеломе, например, антиген созревания В-клеток (BCMA), сопряженный с G-белком рецептор, класса C, группы 5, член D (GPRC5D), CD38 (гидролаза циклической АДФ-рибозы), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, CD2 подгруппы 1, CRACC, SLAMF7, CD319, и 19A24), BAFF-R, TACI и/или FcRH5. Другие 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 некоторых вариантах осуществления, антигены включают антигены, присутствующие на лимфоидных опухолях, миеломе, ассоциированной со СПИД лимфоме и/или посттрансплантационных лимфопролиферациях, такие как CD38. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты нацеленные против таких антигенов, известны и включают, например, описанные в Патенте США No. 8153765; 8603477, 8008450; Патентной публикации США No. US20120189622 или US20100260748; и/или Международных публикациях PCT No. WO2006099875, WO2009080829 или WO2012092612, или WO2014210064. В некоторых вариантах осуществления, такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (например, scFv) содержатся в мультиспецифических антителах, мультиспецифических

химерных рецепторах, таких как мультиспецифические CAR, и/или мультиспецифических клетках.

[0424] В некоторых вариантах осуществления, заболевание или нарушение ассоциировано с экспрессией сопряженного с G-белком рецептора, класса C, группы 5, члена D (GPRC5D) и/или экспрессией антигена созревания В-клеток (BCMA).

[0425] В некоторых вариантах осуществления, заболевание или нарушение представляет собой связанное с В клетками нарушение. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления представленных способов, заболевание или нарушение, ассоциированное с BCMA, представляет собой аутоиммунное заболевание или нарушение. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления представленных 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 Чагаса, болезнь Грэйва, гранулематоз Вегенера, узелковый полиартериит, синдром Шегрена, обыкновенную пузырчатку, склеродермию, рассеянный склероз, псориаз, IgA-нефропатию, IgM-полиневропатию, васкулит, сахарный диабет, синдром Рейно, антифосфолипидный синдром, болезнь Гудпасчера, болезнь Кавасаки, аутоиммунную гемолитическую анемию, миастению, или прогрессивный гломерулонефрит.

[0426] В некоторых вариантах осуществления, заболевание или нарушение представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой экспрессирующую GPRC5D злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой злокачественное новообразование из плазматических клеток и злокачественное новообразование из плазматических клеток представляет собой множественную миелому (MM) или плазмацитому. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому (MM). В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рецидивирующую/невосприимчивую множественную миелому.

[0427] В некоторых вариантах осуществления, клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют посредством аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, отличного от субъекта, подлежащего проведению клеточной терапии или в конечном счете подлежащего проведению клеточной терапии, например, первого субъекта. В таких вариантах осуществления, клетки затем вводят другому субъекту, например, второму субъекту, того же вида. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй субъекты являются генетически идентичными. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй субъекты являются генетически сходными. В некоторых вариантах

осуществления, второй субъект экспрессирует HLA такого же класса или супертипа, что и первый субъект.

[0428] Клетки можно вводить любыми пригодными способами, например, посредством болюсной инфузии, посредством инъекции, например, внутривенной или подкожной инъекций, внутриглазной инъекции, периокулярной инъекции, субретинальной инъекции, инъекции в стекловидное тело, инъекции посредством прокола перегородки, субсклеральной инъекции, интрахороидальной инъекции, интракамеральной инъекции, субконъюнктивальной инъекции, инъекции в субтенозово пространство, ретробульбарной инъекции, перибульбарной инъекции или задней окологсклеральной доставки. В некоторых вариантах осуществления, их вводят посредством парентерального, внутрилегочного и интраназального, и, если желательно для местного лечения, внутриочагового введения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления, данную дозу вводят посредством однократного болюсного введения клеток. В некоторых вариантах осуществления, ее вводят посредством множества болюсных введений клеток, например, в течение периода не более чем 3 суток, или посредством введения клеток непрерывной инфузией. В некоторых вариантах осуществления, введение дозы клеток или проведение дополнительных видов терапии, например, противолимфоцитарной терапии, терапевтического вмешательства и/или комбинированной терапии, проводят посредством амбулаторной доставки.

[0429] Для предотвращения или лечения заболеваний, соответствующая доза может зависеть от типа заболеваний, подлежащих лечению, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, того, вводят ли клетки для профилактических или терапевтических целей, предшествующей терапии, анамнеза субъекта и ответа на клетки, и решения лечащего терапевта. Композиции и клетки, в некоторых вариантах осуществления, подходящим образом вводят субъекту за один раз или на протяжении серий обработок.

[0430] В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят в качестве части комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством, например, с антителом или модифицированной клеткой, или рецептором, или средством, таким как цитотоксическое или лекарственное средство. Клетки, в некоторых вариантах осуществления, вводят совместно с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами или в сочетании с другим терапевтическим вмешательством, либо одновременно, либо последовательно, в любом порядке. В некоторых контекстах, клетки вводят совместно с другой терапией достаточно близко по времени, таким образом, что популяции клеток усиливают эффект одного или нескольких дополнительных лекарственных средств, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят перед одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами. В некоторых вариантах

осуществления, клетки вводят после одного или нескольких дополнительных лекарственных средств. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько дополнительных средств включают цитокин, такой как IL-2, например, для улучшения персистенции. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение химиотерапевтического средства.

[0431] В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение химиотерапевтического средства, например, подготовительного химиотерапевтического средства, например, для уменьшения опухолевой нагрузки перед введением.

[0432] Предварительная подготовка субъектов с использованием видов иммуноистощающей (например, противолимфоцитарной) терапии, в некоторых аспектах, может улучшать эффекты адоптивной клеточной терапии (АСТ).

[0433] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, способы включают введение средства для предварительной подготовки, такого как противолимфоцитарное или химиотерапевтическое средство, например, циклофосфида, флударабина или их комбинаций, субъекту перед началом клеточной терапии. Например, субъекту можно вводить средство для предварительной подготовки по меньшей мере за 2 суток до, например, по меньшей мере за 3, 4, 5, 6 или 7 суток до начала клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят средство для предварительной подготовки не более чем за 7 суток до, например, не более чем за 6, 5, 4, 3 или 2 суток до начала клеточной терапии.

[0434] В некоторых вариантах осуществления, субъекта подвергают предварительной подготовке с использованием циклофосфида в дозе между или между приблизительно 20 мг/кг и 100 мг/кг, например, между или между приблизительно 40 мг/кг и 80 мг/кг. В некоторых аспектах, субъекта подвергают предварительной подготовке с использованием или с использованием приблизительно 60 мг/кг циклофосфида. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфид можно вводить в однократной дозе или можно вводить в множестве доз, например, вводимых ежедневно, на каждые вторые сутки или на каждые третьи сутки. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфид вводят один раз в сутки в течение одних или двух суток. В некоторых вариантах осуществления, когда противолимфоцитарное средство содержит циклофосфид, субъекту вводят циклофосфид в дозе между или между приблизительно 100 мг/м² и 500 мг/м², например, между или между приблизительно 200 мг/м² и 400 мг/м², или 250 мг/м² и 350 мг/м², включительно. В некоторых случаях, субъекту вводят приблизительно 300 мг/м² циклофосфида. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфид можно вводить в однократной дозе или можно вводить в множестве доз, например, вводимых ежедневно, на каждые вторые сутки или на каждые третьи сутки. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфид вводят ежедневно, например, в течение 1-5 суток, например, в течение 3-5 суток. В некоторых случаях, субъекту вводят приблизительно 300 мг/м² циклофосфида, ежедневно в течение 3 суток, до начала клеточной терапии.

[0435] В некоторых вариантах осуществления, когда противолимфоцитарное средство содержит флударабин, субъекту вводят флударабин в дозе между или между приблизительно 1 мг/м^2 и 100 мг/м^2 , например, между или между приблизительно 10 мг/м^2 и 75 мг/м^2 , 15 мг/м^2 и 50 мг/м^2 , 20 мг/м^2 и 40 мг/м^2 или 24 мг/м^2 и 35 мг/м^2 , включительно. В некоторых случаях, субъекту вводят приблизительно 30 мг/м^2 флударабина. В некоторых вариантах осуществления, флударабин можно вводить в однократной дозе или можно вводить в множестве доз, например, вводимых ежедневно, на каждые вторые сутки или на каждые третьи сутки. В некоторых вариантах осуществления, флударабин вводят ежедневно, например, в течение 1-5 суток, например, в течение 3-5 суток. В некоторых случаях, субъекту вводят приблизительно 30 мг/м^2 флударабина, ежедневно в течение 3 суток, до начала клеточной терапии.

[0436] В некоторых вариантах осуществления, противолимфоцитарное средство содержит комбинацию средств, например, комбинацию циклофосфида и флударабина. Таким образом, комбинация средств может включать циклофосфамид в любой дозе или с любым расписанием введения, такими как описанные выше, и флударабин в любой дозе или с любым расписанием введения, такими как описанные выше. Например, в некоторых аспектах, субъекту вводят 60 мг/кг ($\sim 2 \text{ г/м}^2$) циклофосфида и 3-5 доз по 25 мг/м^2 флударабина перед первой или последующей дозой.

[0437] После введения клеток, биологическую активность модифицированных популяций клеток в некоторых вариантах осуществления измеряют, например, посредством любого из ряда известных способов. Параметры для оценки включают специфическое связывание модифицированной или природной Т-клетки, или другого иммунита с антигеном, *in vivo*, например, посредством визуализации, или *ex vivo*, например, посредством ELISA или проточной цитометрии. В конкретных вариантах осуществления, способность модифицированных клеток разрушать клетки-мишени можно измерять с использованием любого пригодного способа, известного в данной области, такого 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 конкретных вариантах осуществления, биологическую активность клеток измеряют посредством анализа экспрессии и/или секреции одного или нескольких цитокинов, таких как CD107a, IFN γ , IL-2 и TNF. В некоторых аспектах, биологическую активность измеряют посредством оценки клинического исхода, такого как уменьшение опухолевой нагрузки или массы.

[0438] В конкретных вариантах осуществления, модифицированные клетки дополнительно модифицируют любым количеством способов, так что их терапевтическая или профилактическая эффективность увеличивается. Например, сконструированный CAR или TCR, экспрессируемый в популяции, можно конъюгировать, либо напрямую, либо опосредованно через линкер, с нацеливающей группой. Практическое осуществление конъюгации соединений, например, CAR или TCR, с нацеливающими

группами известно. См., например, Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 111 (1995), и Патент США 5087616.

[0439] В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят в качестве части комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством, например, с антителом или модифицированной клеткой, или рецептором, или средством, таким как цитотоксическое или лекарственное средство. Клетки, в некоторых вариантах осуществления, вводят совместно с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами, или в сочетании с другим терапевтическим вмешательством, либо одновременно, либо последовательно, в любом порядке. В некоторых контекстах, клетки вводят совместно с другой терапией достаточно близко по времени, таким образом, что популяции клеток усиливают эффект одного или нескольких дополнительных лекарственных средств, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят перед одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят после одного или нескольких дополнительных лекарственных средств. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько дополнительных средств включают цитокин, такой как IL-2, например, для улучшения персистенции.

А. Дозирование

[0440] В некоторых вариантах осуществления, дозу клеток вводят субъектам в соответствии с представленными способами, и/или с представленными изделиями или композициями. В некоторых вариантах осуществления, размер или расписание введения доз определяют как функцию конкретного заболевания или состояния у субъекта. В некоторых случаях, размер или расписание введения доз для конкретного заболевания с учетом представленного описания можно определять эмпирически.

[0441] В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит между точно или приблизительно 2×10^5 клеток/кг и точно или приблизительно 2×10^6 клеток/кг, например, между точно или приблизительно 4×10^5 клеток/кг и точно или приблизительно 1×10^6 клеток/кг, или между точно или приблизительно 6×10^5 клеток/кг и точно или приблизительно 8×10^5 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит не более чем 2×10^5 клеток (например, экспрессирующих антиген, таких как экспрессирующих CAR клеток) на килограмм массы тела субъекта (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 некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит по меньшей мере точно или приблизительно, или точно или приблизительно 2×10^5 клеток (например,

экспрессирующих антиген, таких как экспрессирующих CAR клеток) на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, по меньшей мере точно или приблизительно, или точно или приблизительно 3×10^5 клеток/кг, по меньшей мере точно или приблизительно, или точно или приблизительно 4×10^5 клеток/кг, по меньшей мере точно или приблизительно, или точно или приблизительно 5×10^5 клеток/кг, по меньшей мере точно или приблизительно, или точно или приблизительно 6×10^5 клеток/кг, по меньшей мере точно или приблизительно, или точно или приблизительно 7×10^5 клеток/кг, по меньшей мере точно или приблизительно, или точно или приблизительно 8×10^5 клеток/кг, по меньшей мере точно или приблизительно, или точно или приблизительно 9×10^5 клеток/кг, по меньшей мере точно или приблизительно, или точно или приблизительно 1×10^6 клеток/кг, или по меньшей мере точно или приблизительно, или точно или приблизительно 2×10^6 клеток/кг.

[0442] В конкретных вариантах осуществления, клетки, или индивидуальные популяции подтипов клеток, вводят субъекту в диапазоне от точно или приблизительно 0,1 миллионов до точно или приблизительно 100 миллиардов клеток и/или в количестве клеток на килограмм массы тела субъекта, например, таком как от точно или приблизительно 0,1 миллионов 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 в диапазоне, определяемом любыми двумя из предшествующих значений), от точно или приблизительно 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 в диапазоне, определяемом любыми двумя из предшествующих значений), таком как от точно или приблизительно 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 в диапазоне, определяемом любыми двумя из предшествующих значений), и в некоторых случаях от точно или приблизительно 100 миллионов клеток до точно или

приблизительно 50 миллиардов клеток (например, от точно или приблизительно 120 миллионов клеток, точно или приблизительно 250 миллионов клеток, точно или приблизительно 350 миллионов клеток, 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 миллиарда клеток, точно или приблизительно 30 миллиардов клеток, точно или приблизительно 45 миллиардов клеток) или в любом количестве в пределах этих диапазонов и/или на килограмм массы тела субъекта. Дозы можно менять в зависимости от признаков, специфических для заболевания или нарушения, и/или пациента, и/или другого лечения.

[0443] В некоторых вариантах осуществления, доза клеток представляет собой постоянную дозу клеток или фиксированную дозу клеток, так что доза клеток не связана или не основана на площади поверхности тела или массе субъекта. В некоторых вариантах осуществления, такие значения относятся к количествам экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток; в других вариантах осуществления, они относятся к количествам Т-клеток или РВМС, или тотальных введенных клеток.

[0444] В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъект представляет собой человека, доза включает менее чем приблизительно 5×10^8 тотальных экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), например, в диапазоне от приблизительно 1×10^6 до 5×10^8 таких клеток, например, 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 или 5×10^8 , от точно или приблизительно 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 таких тотальных клеток, или в диапазоне между любыми двумя из предшествующих значений. В некоторых вариантах осуществления, например, где субъект представляет собой человека, доза включает более чем точно или приблизительно 1×10^6 тотальных экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (РВМС) и менее чем точно или приблизительно 2×10^9 тотальных экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), например, в диапазоне от точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$ до точно или приблизительно $1,2 \times 10^9$ таких клеток, например, точно или приблизительно $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$, 8×10^8 или $1,2 \times 10^9$ таких тотальных клеток, или в диапазоне между любыми двумя из предшествующих значений.

[0445] В некоторых вариантах осуществления, доза генетически модифицированных клеток содержит от точно или приблизительно 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 тотальных экспрессирующих CAR (CAR+) Т-клеток, от точно или приблизительно 1×10^5 до точно или приблизительно $2,5 \times 10^8$ тотальных экспрессирующих CAR Т-клеток, от точно или приблизительно 1×10^5 до точно или приблизительно 1×10^8 тотальных экспрессирующих CAR Т-клеток, от точно или приблизительно 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^7 тотальных экспрессирующих CAR Т-клеток, от точно или

[illegible]

[0447] В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от точно или приблизительно 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 тотальных экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, тотальных Т-клеток или тотальных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC), от точно или приблизительно 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 тотальных экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, тотальных Т-клеток или тотальных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC), или от точно или приблизительно 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 тотальных экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, тотальных Т-клеток, или тотальных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC), включая каждое. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы клеток, содержащей количество клеток по меньшей мере точно или приблизительно 1×10^5 тотальных экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, тотальных Т-клеток, или тотальных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC), например, по меньшей мере точно или приблизительно 1×10^6 , по меньшей мере точно или приблизительно 1×10^7 , по меньшей мере точно или приблизительно 1×10^8 таких клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество указано, применительно к общему количеству экспрессирующих CD3 или экспрессирующих CD8, в некоторых случаях, экспрессирующих также рекомбинантный рецептор (например, экспрессирующих CAR) клеток. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от точно или приблизительно 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 экспрессирующих CD3 или экспрессирующих CD8 тотальных Т-клеток, или экспрессирующих CD3 или экспрессирующих CD8, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, от точно или приблизительно 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 экспрессирующих CD3, или экспрессирующих CD8 тотальных Т-клеток или экспрессирующих CD3 или экспрессирующих CD8, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, или от точно или приблизительно 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 экспрессирующих CD3 или экспрессирующих CD8 тотальных Т-клеток, или экспрессирующих CD3 или экспрессирующих CD8, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, включая каждое. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от точно или приблизительно 1×10^5 до точно или приблизительно 5×10^8 тотальных экспрессирующих CD3/экспрессирующих CAR или экспрессирующих CD8/экспрессирующих CAR клеток, от точно или приблизительно 5×10^5 до точно или приблизительно 1×10^7 тотальных экспрессирующих CD3/экспрессирующих CAR или экспрессирующих CD8/экспрессирующих CAR клеток, или от точно или приблизительно 1×10^6 до точно или приблизительно 1×10^7 тотальных экспрессирующих CD3/экспрессирующих CAR или экспрессирующих CD8/экспрессирующих CAR клеток, включая каждое.

[0448] В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки из дозы включают CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или CD4+ и CD8+ Т-клетки.

[0449] В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъект представляет собой человека, количество CD8⁺ Т-клеток из дозы, включая дозу, включающую CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, включает между точно или приблизительно 1×10^6 и точно или приблизительно 5×10^8 тотальных экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) CD8⁺ клеток, например, в диапазоне от точно или приблизительно 5×10^6 до точно или приблизительно 1×10^8 таких клеток, например, 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$ или 5×10^8 таких тотальных клеток, или в диапазоне между любыми двумя из предшествующих значений. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят множество доз, и каждая из доз или суммарная доза может находиться между любыми из предшествующих значений. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит введение от точно или приблизительно 1×10^7 до точно или приблизительно $0,75 \times 10^8$ тотальных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, от точно или приблизительно 1×10^7 до точно или приблизительно 5×10^7 тотальных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, от точно или приблизительно 1×10^7 до точно или приблизительно $0,25 \times 10^8$ тотальных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток, включая каждое. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит введение 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 тотальных экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8⁺ Т-клеток.

[0450] В некоторых вариантах осуществления, дозу клеток, например, экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, вводят субъекту в форме однократной дозы или вводят только один раз в пределах периода двух недель, одного месяца, трех месяцев, шести месяцев, 1 года или более.

[0451] В контексте адоптивной клеточной терапии, введение данной «дозы» включает введение данного уровня или количества клеток в форме одиночной композиции и/или однократного непрерывного введения, например, в форме однократной инъекции или непрерывной инфузии, а также включает введение данного уровня или количества клеток в форме дробной дозы, представленной во множестве индивидуальных композиций или инфузий, на протяжении указанного периода времени, который составляет не более 3 суток. Таким образом, в некоторых контекстах, доза представляет собой однократное или непрерывное введение указанного количества клеток, проведенное или начатое в отдельной временной точке. В некоторых контекстах, однако, дозу вводят во множестве инъекций или инфузий на протяжении периода не более трех суток, например, один раз в сутки в течение трех суток или в течение двух суток, или посредством множества инфузий на протяжении периода одних суток.

[0452] Таким образом, в некоторых аспектах, клетки из дозы вводят в одной фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления, клетки из дозы вводят во множестве композиций, совместно содержащих клетки из дозы.

[0453] В некоторых вариантах осуществления, термин «дробная доза» относится к дозе, которая разделена таким образом, что ее вводят на протяжении более чем одних суток. Этот тип дозирования включают в настоящие способы и считают представляющим собой однократную дозу.

[0454] Таким образом, дозу клеток можно вводить в форме дробной дозы. Например, в некоторых вариантах осуществления, дозу можно вводить субъекту в течение 2 суток или в течение 3 суток. Иллюстративные способы дробного дозирования включают введение 25% дозы на первые сутки и введение оставшихся 75% дозы на вторые сутки. В других вариантах осуществления, 33% из первой дозы можно вводить на первые сутки и оставшиеся 67% вводить на вторые сутки. В некоторых аспектах, 10% дозы вводят на первые сутки, 30% дозы вводят на вторые сутки и 60% дозы вводят на третьи сутки. В некоторых вариантах осуществления, дробную дозу не распределяют более чем на 3 суток.

[0455] В некоторых вариантах осуществления, клетки из дозы можно вводить посредством введения множества композиций или растворов, таких как первый и второй, необязательно, больший, каждый из которых содержит некоторое количество клеток из дозы. В некоторых аспектах, множество композиций, каждая из которых 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 $CD4^+$ популяции, соответственно, например, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клетки, каждые индивидуально, включая клетки, генетически модифицированные для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, введение дозы включает введение первой композиции, содержащей дозу $CD8^+$ Т-клеток или дозу $CD4^+$ Т-клеток, и введение второй композиции, содержащей другую дозу $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток.

[0456] В некоторых вариантах осуществления, введение композиции или дозы, например, введение множества композиций клеток, включает введение композиций клеток отдельно. В некоторых аспектах, отдельные введения проводят одновременно, или последовательно, в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления, доза содержит первую композицию и вторую композицию, и первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от точно или приблизительно 0 до точно или приблизительно 12 часов, с интервалом от точно или приблизительно 0 до точно или приблизительно 6 часов, или с интервалом от точно или приблизительно 0 до точно или приблизительно 2 часов. В некоторых вариантах осуществления, начало введения первой композиции и начало введения второй композиции осуществляют с интервалом не более чем точно или приблизительно 2 часа, не более чем точно или приблизительно 1 часа, или не более чем точно или приблизительно 30 минут, с интервалом не более чем точно или приблизительно 15 минут, не более чем точно или приблизительно 10 минут, или не более чем точно или приблизительно 5 минут. В некоторых вариантах осуществления, начало

и/или завершение введения первой композиции и завершение и/или начало введения второй композиции осуществляют с интервалом не более чем точно или приблизительно 2 часов, не более чем точно или приблизительно 1 часа, или не более чем точно или приблизительно 30 минут, с интервалом не более чем точно или приблизительно 15 минут, не более чем точно или приблизительно 10 минут, или не более чем точно или приблизительно 5 минут.

[0457] В некоторых композициях, первая композиция, например, первая композиция из дозы, содержит $CD4^+$ Т-клетки. В некоторых композициях, первая композиция, например, первая композиция из дозы, содержит $CD8^+$ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, первую композицию вводят до второй композиции.

[0458] В некоторых вариантах осуществления, доза или композиция клеток включает определенное или целевое соотношение $CD4^+$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и $CD8^+$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и/или $CD4^+$ клеток и $CD8^+$ клеток, где соотношение, необязательно, составляет приблизительно 1:1 или составляет между приблизительно 1:3 и приблизительно 3:1, например, приблизительно 1:1. В некоторых аспектах, введение композиции или дозы с целевым или желательным соотношением различных популяций клеток (например, соотношением $CD4^+ : CD8^+$ или соотношением $CAR^+CD4^+ : CAR^+CD8^+$, например, 1:1) включает введение композиции клеток, содержащей одну из популяций, и затем введение отдельной композиции клеток, содержащей другую из популяций, где введение проводят при или приблизительно при целевом или желательном соотношении. В некоторых аспектах, введение дозы или композиции клеток в определенном соотношении приводит к улучшенному размножению, персистенции и/или противоопухолевой активности при Т-клеточной терапии.

[0459] В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят множество доз, например, две или более дозы, или множество последовательных доз, клеток. В некоторых вариантах осуществления, две дозы вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят последующую 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 суток после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, множество последовательных доз вводят после первой дозы, таким образом, что дополнительную дозу или дозы вводят после введения последующей дозы. В некоторых аспектах, количество клеток, введенных субъекту в дополнительной дозе, является одинаковым или сходным с первой дозой и/или последующей дозой. В некоторых вариантах осуществления, дополнительные доза или дозы превышают предшествующие дозы.

[0460] В некоторых аспектах, размер первой и/или последующей дозы определяют на основании одного или нескольких критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например, химиотерапию, нагрузка заболевания у субъекта, такая как нагрузка, объем, размер опухоли, или степень, обширность или тип метастазирования, стадия, и/или вероятность, или частота у субъекта развития токсичных

исходов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности, и/или иммунного ответа хозяина против введенных клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

[0461] В некоторых аспектах, время между введением первой дозы и введением последующей дозы составляет от приблизительно 9 до приблизительно 35 суток, от приблизительно 14 до приблизительно 28 суток или от 15 до 27 суток. В некоторых вариантах осуществления, введение последующей дозы происходит во временной точке через более чем приблизительно 14 суток после и менее чем приблизительно 28 суток после введения первой дозы. В некоторых аспектах, время между первой и последующей дозой составляет приблизительно 21 суток. В некоторых вариантах осуществления, дополнительные дозу или дозы, например, последующие дозы, вводят после введения последующей дозы. В некоторых аспектах, дополнительные последующие дозу или дозы, вводят через по меньшей мере приблизительно 14 и менее чем приблизительно 28 суток после введения предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления, дополнительную дозу вводят менее чем приблизительно 14 суток после предшествующей дозы, например, через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 суток после предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления, никаких доз не вводят менее чем приблизительно 14 суток после предшествующей дозы, и/или никаких доз не вводят более чем приблизительно 28 суток после предшествующей дозы.

[0462] В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, например, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, содержит две дозы (например, двойную дозу), содержащие первую дозу Т-клеток и последующую дозу Т-клеток, где одна или обе из первой дозы и второй дозы включает введение дробной дозы Т-клеток.

[0463] В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, как правило, является достаточно большой, чтобы являться эффективной для уменьшения нагрузки заболевания.

[0464] В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят в желательной дозе, которая, в некоторых аспектах, включает желательную дозу или количество клеток или типа(типов) клеток и/или желательное соотношение типов клеток. Таким образом, доза клеток в некоторых вариантах осуществления основана на общем количестве клеток (или количестве на кг массы тела) и желательном соотношении индивидуальных популяций или подтипов, таком как соотношение $CD4^+$ к $CD8^+$. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток основана на желательном общем количестве (или количестве на кг массы тела) клеток в индивидуальных популяциях или индивидуальных типах клеток. В некоторых вариантах осуществления, доза основана на комбинации таких признаков, например, желательного общего количества клеток, желательного соотношения и желательного общего количества клеток в индивидуальных популяциях.

[0465] В некоторых вариантах осуществления, популяции или подтипы клеток, таких как $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки, вводят в желательной дозе или в пределах допустимых различий желательной дозы тотальных клеток, например, желательной дозы Т-клеток. В некоторых аспектах, желательная доза представляет собой желательное количество клеток

или желательное количество клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, например, клеток/кг. В некоторых аспектах, желательная доза представляет собой или превышает минимальное количество клеток или минимальное количество клеток на единицу массы тела. В некоторых аспектах, среди тотальных клеток, введенных в желательной дозе, индивидуальные популяции или подтипы присутствуют в желательном соотношении или приблизительно в желательном соотношении на выходе (таком как соотношение $CD4^+$ и $CD8^+$), например, в пределах определенных допустимых различий или ошибки такого соотношения.

[0466] В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят в желательной дозе или в пределах допустимых различий желательной дозы одной или нескольких из индивидуальных популяций или подтипов клеток, такой как желательная доза $CD4^+$ клеток и/или желательная доза $CD8^+$ клеток. В некоторых аспектах, желательная доза представляет собой желательное количество клеток из подтипа или популяции, или желательное количество таких клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, например, клеток/кг. В некоторых аспектах, желательная доза представляет собой или превышает минимальное количество клеток из популяции или подтипа, или минимальное количество клеток из популяции или подтипа на единицу массы тела.

[0467] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, дозирование основано на желательной фиксированной дозе тотальных клеток и желательном соотношении, и/или основано на желательной фиксированной дозе одного или нескольких, например, каждого, из индивидуальных подтипов или субпопуляций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, дозирование основано на желательной фиксированной или минимальной дозе Т-клеток и желательном соотношении $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток, и/или основано на желательной фиксированной или минимальной дозе $CD4^+$ и/или $CD8^+$ клеток.

[0468] В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят в желательном соотношении на выходе или в пределах допустимого диапазона желательного соотношения на выходе множества популяций или подтипов клеток, таких как $CD4^+$ и $CD8^+$ клетки или подтипы. В некоторых аспектах, желательное соотношение может представлять собой конкретное соотношение или может представлять собой диапазон соотношений. Например, в некоторых вариантах осуществления, желательное соотношение (например, соотношение $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток) составляет между точно или приблизительно 5:1 и точно или приблизительно 5:1 (или более чем приблизительно 1:5 и менее чем приблизительно 5:1), или между точно или приблизительно 1:3 и точно или приблизительно 3:1 (или более чем приблизительно 1:3 и менее чем приблизительно 3:1), например, между точно или приблизительно 2:1 и 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 некоторых аспектах, допустимое различие 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 желательного соотношения, включая любое количество в пределах этих диапазонов.

[0469] 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 введенных всех клеток, Т-клеток, или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

[0470] В некоторых аспектах, размер дозы определяют на основании одного или нескольких критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например, химиотерапию, нагрузка заболевания у субъекта, такая как нагрузка, объем, размер опухоли, или степень, обширность или тип метастазирования, стадия, и/или вероятность или частота у субъекта развития токсичных исходов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности, и/или иммунного ответа хозяина против введенных клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

[0471] В некоторых вариантах осуществления, способы также включают введение одной или нескольких дополнительных доз клеток, экспрессирующих химерный рецептор антигена (CAR), и/или проведение противолимфоцитарной терапии, и/или одну или несколько стадий способов повторяют. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько дополнительных доз являются такими же, как начальная доза. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько дополнительных доз отличаются от начальной дозы, например, выше, например, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз, или более выше, чем начальная доза, или ниже, например, ниже, например, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз, или более ниже, чем начальная доза. В некоторых вариантах осуществления, введение одной или нескольких дополнительных доз определяют на основании ответа субъекта на начальное лечение или любое предшествующее лечение, нагрузки заболевания у субъекта, такой как нагрузка, объем, размер опухоли, или степень, обширность или тип метастазирования, стадия, и/или вероятность или частота у субъекта развития токсичных исходов, например, CRS, синдром активации макрофагов, синдром лизиса опухоли, нейротоксичность и/или иммунный ответ хозяина против введенных клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

В. Оценка введенных клеток

[0472] В некоторых случаях, представленные способы можно использовать для определения присутствия, отсутствия или количества модифицированных клеток в образце от субъекта, после введения модифицированных клеток или композиций клеток, например, содержащих клетки, в которые интегрированы последовательности трансгена. В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для оценки присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в конкретном

образце, полученном от субъекта, которому введены модифицированные клетки или композиция клеток, такие как полученные с использованием способов, описанных в настоящем описании, например, в разделе II выше. В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для оценки фармакокинетических (PK) или фармакодинамических (PD) параметров введенных модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, фармакокинетические параметры включают максимальную (пиковую) концентрацию в плазме ($C_{\text{макс.}}$), пиковое время (т.е., когда возникает максимальная концентрация в плазме ($C_{\text{макс.}}$); $T_{\text{макс.}}$), минимальную концентрацию в плазме (т.е., минимальную концентрацию в плазме между дозами лекарственного средства, например, CAR⁺ Т-клеток; $C_{\text{мин.}}$), время полувыведения ($T_{1/2}$) и площадь под кривой (т.е., площадь под кривой, полученной при нанесении на график времени против концентрации в плазме лекарственного средства CAR⁺ Т-клеток; AUC), после введения.

[0473] В некоторых аспектах, иллюстративный вариант осуществления включает оценку и/или мониторинг фармакокинетических параметров, например, количества или концентрации CAR⁺ Т-клеток, в образце, полученном от субъекта, которому введены модифицированные клетки или композиция, содержащая модифицированные клетки, например, в крови, и/или количества или концентрации последовательностей трансгена, присутствующих в образце от субъекта. В некоторых аспектах, иллюстративный вариант осуществления включает оценку и/или мониторинг фармакокинетических параметров, например, количества или концентрации CAR⁺ Т-клеток в крови. В некоторых вариантах осуществления, способы включают мониторинг количеств и/или концентрации CAR⁺ Т-клеток в крови, например, посредством определения присутствия, отсутствия и/или количества последовательности трансгена в крови, например, как описано в разделе I.C.3 выше.

V. НАБОРЫ И ИЗДЕЛИЯ

[0474] Настоящее изобретение относится также к наборам и изделиям, таким как наборы и изделия, содержащие реагенты для осуществления способов, представленных в настоящем описании, например, реагентам для оценки присутствия, отсутствия и/или количества интегрированных последовательностей трансгена. В некоторых аспектах, наборы или изделия могут также содержать реагенты и/или нуклеиновые кислоты для использования в способах модификации или продукции для получения модифицированных клеток.

[0475] В некоторых вариантах осуществления, наборы могут содержать реагенты и/или расходные материалы, необходимые для выделения нуклеиновых кислот из образцов и/или отделения, или выделения нуклеиновых кислот, на основании размера или молекулярной массы, и/или определения присутствия, отсутствия и/или количества интегрированной последовательности трансгена. В некоторых вариантах осуществления, наборы содержат реагенты и/или расходные материалы для отделения или выделения высоко- или низкомолекулярной фракции ДНК, такие как реагенты и расходные

материалы для электрофореза в геле в пульсирующем поле (PFGE). В некоторых вариантах осуществления, наборы содержат матрикс или гель, или картриджи, содержащие матрикс или гель, для осуществления стадий отделения или выделения высоко- или низкомолекулярной фракции ДНК. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к наборам, содержащим один или несколько зондов, и/или один или несколько праймеров, например, пару праймеров, специфических для всей или части последовательности трансгена. В некоторых аспектах, зонды и/или праймер могут специфически связывать или узнавать, или детектировать всю или часть последовательности трансгена. В некоторых аспектах, набор может содержать реагенты и расходные материалы, необходимые для полимеразной цепной реакции (ПЦР), например, для количественной ПЦР (qПЦР), цифровой ПЦР (цПЦР) или капельной цифровой ПЦР (кцПЦР).

[0476] В некоторых вариантах осуществления, наборы, необязательно, содержат другие компоненты, например: праймеры для ПЦР, реагенты для ПЦР, такие как полимеразы, буфер, нуклеотиды, реагенты для дополнительных анализов, например, внутриклеточного окрашивания цитокинов, проточной цитометрии, иммунопреципитации хроматина и/или дополнительных анализов. В некоторых вариантах осуществления, реагенты для дополнительных анализов включают компоненты для проведения анализа *in vitro* для измерения экспрессии или уровня конкретной молекулы. В некоторых случаях, анализ *in vitro* представляет собой иммуноанализ, анализ на основе аптамеров, гистологический или цитологический анализ, или анализ уровня экспрессии мРНК. В некоторых вариантах осуществления, анализ *in vitro* выбран среди твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), иммуноблоттинга, иммунопреципитации, радиоиммунного анализа (RIA), иммуноокрашивания, анализа проточной цитометрии, поверхностного плазмонного резонанса (SPR), анализа хемилюминесценции, иммунохроматографического анализа на тест-полосках, анализа ингибирования и анализа авидности. В некоторых аспектах, реагент представляет собой связывающий реагент, который специфически связывает молекулы. В некоторых случаях, связывающий реагент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, аптамер или зонд на основе нуклеиновой кислоты. Различные компоненты набора могут присутствовать в отдельных контейнерах, или конкретные совместимые компоненты можно предварительно объединять в одном контейнере. В некоторых вариантах осуществления, наборы дополнительно содержат инструкции для использования компонентов набора для практического осуществления представленных способов.

VI. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0477] Если не определено иное, все термины в данной области, условные сокращения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в настоящем описании, предназначены, чтобы иметь такое же значение, которое является общепринятым для специалиста в области, к которой относится заявленный объект изобретения. В некоторых случаях, термины с общепринятыми значениями определены в

настоящем описании для ясности и/или для быстрой ссылки, и включение таких определений в настоящее описание не следует обязательно рассматривать как представляющее значительное различие с общепринятыми в данной области.

[0478] В рамках изобретения, термин «трансген» или «последовательности трансгена» (в некоторых случаях, называемые также химерными, рекомбинантными, гетерологичными, экзогенными последовательностями или химерной, рекомбинантной, гетерологичной, экзогенной ДНК) относятся к последовательностям нуклеиновой кислоты, полученным искусственно посредством комбинирования составляющих из различных источников, таких как различные организмы, различные гены или различные варианты. В некоторых аспектах, последовательности трансгена подвергают молекулярно-биологической манипуляции, например, посредством искусственного комбинирования различных молекул нуклеиновой кислоты или фрагментов из различных источников. В некоторых вариантах осуществления, последовательности трансгена содержат по меньшей мере некоторую часть последовательностей, происходящих из отличного источника, по сравнению с геномной последовательностью клеток, в которые вводят полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена. В некоторых случаях, по меньшей мере часть последовательности трансгена является гетерологичной, экзогенной или трансгенной для клетки, в которую последовательность трансгена вводят, и может включать кодирующие и/или не кодирующие последовательности. В некоторых аспектах, последовательность трансгена может относиться к последовательностям, интегрированным в геном клетки, в которую вводят последовательность трансгена.

[0479] В рамках изобретения, формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного. Например, форма единственного числа обозначает «по меньшей мере один» или «один или несколько». Понятно, что аспекты и варианты, описанные в настоящем описании, включают «состоящие» и/или «в основном состоящие из» аспекты и варианты.

[0480] Термин «приблизительно», в рамках изобретения, относится к обычному диапазону ошибки для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области. Ссылка на «приблизительное» значение или параметр в настоящем описании включает (и описывает) варианты осуществления, которые относятся к этому значению или параметру по существу. Например, описание, относящееся к «приблизительно X», включает описание «X».

[0481] На протяжении этого описания, различные аспекты заявленного объекта изобретения представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона присутствует просто для удобства и краткости, и его не следует рассматривать как жесткое ограничения объема заявленного объекта изобретения. Соответственно, описание диапазона следует рассматривать как конкретно описывающее все возможные поддиапазоны, так же как индивидуальные числовые значения внутри этого диапазона. Например, когда представлен диапазон значений, понятно, что каждое промежуточное значение, между верхним и нижним пределами этого диапазона, и любым

другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне включено в заявленный объект изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, а также включены в заявленный объект изобретения, ограниченный любым конкретно исключенным пределом в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие любой или оба из этих включенных пределов, также включены в заявленный объект изобретения. Это применимо вне зависимости от ширины диапазона.

[0482] В рамках изобретения, композиция относится к любой смеси из двух или более продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Она может представлять собой раствор, суспензию, жидкость, порошок, пасту, водную, неводную или любую их комбинацию.

[0483] В рамках изобретения, утверждение, что клетка или популяция клеток является «положительной» по конкретному маркеру, относится к поддающемуся детекции присутствию на или в клетке конкретного маркера, как правило, поверхностного маркера. Применительно к поверхностному маркеру, термин относится к присутствию поверхностной экспрессии, как детектировано посредством проточной цитометрии, например, посредством окрашивания с использованием антитела, которое специфически связывается с маркером, и детекции указанного антитела, где окрашивание поддается детекции посредством проточной цитометрии на уровне значительно выше окрашивания, детектированного при осуществлении такого же способа для совпадающего по изотипу контроля, в идентичных в ином отношении условиях, и/или на уровне, по существу сходном с уровнем для клетки, как известно, положительной по этому маркеру, и/или на уровне значительно выше уровня для клетки, как известно, отрицательной по этому маркеру.

[0484] В рамках изобретения, утверждение, что клетка или популяция клеток является «отрицательной» по конкретному маркеру, относится к отсутствию значительного поддающегося детекции присутствия на или в клетке конкретного маркера, как правило, поверхностного маркера. Применительно к поверхностному маркеру, термин относится к отсутствию поверхностной экспрессии, как детектировано посредством проточной цитометрии, например, посредством окрашивания с использованием антитела, которое специфически связывается с маркером, и детекции указанного антитела, где окрашивание не детектировано посредством проточной цитометрии на уровне значительно выше окрашивания, детектированного при осуществлении такого же способа для совпадающего по изотипу контроля, в идентичных в ином отношении условиях, и/или на уровне значительно ниже уровня для клетки, как известно, положительной по этому маркеру, и/или на уровне, по существу сходном с уровнем для клетки, как известно, отрицательной по этому маркеру.

[0485] Термин «вектор», в рамках изобретения, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к размножению другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Термин включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, так

же как вектор, встроенный в геном клетки-хозяина, в которую он введен. Определенные векторы являются способными управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы обозначены в настоящем описании как «экспрессирующие векторы».

[0486] В рамках изобретения, «процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» и «процент идентичности», при использовании применительно к аминокислотной последовательности (эталонной полипептидной последовательности), определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате (например, рассматриваемом антителе или фрагменте), которые являются идентичными аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения пропусков, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и не рассматривая никаких консервативных замен в качестве части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными известными способами, например, с использованием публично доступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Можно определять подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания на протяжении полной длины сравниваемых последовательностей.

[0487] В некоторых вариантах осуществления, «функционально связанный» может включать ассоциацию компонентов, таких как последовательность ДНК (например, гетерологичная нуклеиновая кислота) и регуляторная последовательность(последовательности), таким образом, чтобы позволять экспрессию гена, когда соответствующие молекулы (например, белки - активаторы транскрипции) связываются с регуляторной последовательностью. Таким образом, это означает, что описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предназначенным для них образом.

[0488] Аминокислотная замена может включать замену одной аминокислоты в полипептиде на другую аминокислоту. Замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену. Аминокислотные замены можно вводить в связывающую молекулу, например, представляющее интерес антитело, и проводить скрининг продуктов по желательной активности, например, сохранению/улучшению связывания антигена, уменьшению иммуногенности или улучшению ADCC или CDC.

[0489] Аминокислоты, в общем, можно группировать в соответствии со следующими общими свойствами боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0490] В некоторых вариантах осуществления, консервативные замены могут включать замену члена одного из этих классов на другой член того же класса. В некоторых вариантах осуществления, неконсервативные аминокислотные замены могут включать замену члена одного из этих классов на другой класс.

[0491] В рамках изобретения, «субъект» представляет собой млекопитающее, такое как человек или другое животное, и как правило, представляет собой человека.

VII. ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0492] Среди представленных вариантов осуществления присутствуют:

1. Способ оценки геномной интеграции последовательности трансгена, включающий:

(a) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, где указанная одна или несколько клеток содержит или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок;

(b) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена, интегрированного в геном одной или нескольких клеток.

2. Способ из варианта осуществления 1, где, до отделения, выделяют дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) из одной или нескольких клеток.

3. Способ из варианта осуществления 1 или варианта осуществления 2, где определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена включает определение массы, веса или количества копий последовательности трансгена на диплоидный геном или на клетку в одной или нескольких клетках.

4. Способ по любому из вариантов осуществления 1-3, где одна или несколько клеток содержит популяцию клеток, в которой множество клеток из популяции содержат последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок.

5. Способ из варианта осуществления 4, где количество копий представляет собой среднее или среднее арифметическое количество копий на диплоидный геном или на клетку среди популяции клеток.

6. Способ по любому из вариантов осуществления 1-5, где, до отделения, полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, введен по меньшей мере в одну модифицированную клетку из одной или нескольких клеток.

7. Способ из варианта осуществления 6, где по меньшей мере одна модифицированная клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C,

необязательно, точно или приблизительно $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, в течение более чем 96 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена.

8. Способ из варианта осуществления 6, где по меньшей мере одна модифицированная клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C , необязательно, точно или приблизительно $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, в течение более чем 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена.

9. Способ из варианта осуществления 6, где по меньшей мере одна модифицированная клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C , необязательно, точно или приблизительно $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, в течение более чем 48 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена.

10. Способ по любому из вариантов осуществления 1-9, где одна или несколько клеток криоконсервирована до отделения высокомолекулярной фракции ДНК.

11. Способ по любому из вариантов осуществления 1-10, где одна или несколько клеток представляет собой линию клеток.

12. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, где одна или несколько клеток представляет собой первичную клетку, полученную из образца от субъекта.

13. Способ по любому из варианта осуществления 12, где одна или несколько клеток представляет собой иммуноцит.

14. Способ из варианта осуществления 13, где иммуноцит представляет собой Т-клетку или клетку NK.

15. Способ из варианта осуществления 14, где Т-клетка представляет собой CD3+, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

16. Способ оценки последовательности трансгена в биологическом образце от субъекта, включающий:

(а) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, присутствующих в биологическом образце от субъекта, где биологический образец содержит, или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок; и

(b) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена во всем или части биологического образца.

17. Способ из варианта осуществления 16, где определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в (b) включает определение массы, веса или количества копий последовательности трансгена во всем или части биологического образца.

18. Способ из варианта осуществления 16, где, до отделения, выделяют ДНК из одной или нескольких клеток, присутствующих в биологическом образце.

19. Способ по любому из вариантов осуществления 16-18, где биологический образец получен от субъекта, которому вводили композицию, содержащую по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена.

20. Способ по любому из вариантов осуществления 16-19, где биологический образец представляет собой образец ткани или образец физиологической жидкости.

21. Способ из варианта осуществления 20, где биологический образец представляет собой образец ткани, и ткань представляет собой опухоль.

22. Способ из варианта осуществления 21, где образец ткани представляет собой биоптат опухоли.

23. Способ из варианта осуществления 20, где биологический образец представляет собой образец физиологической жидкости, и образец физиологической жидкости представляет собой образец крови или сыворотки.

24. Способ по любому из вариантов осуществления 16-23, где, до отделения, полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, введен по меньшей мере в одну модифицированную клетку из одной или нескольких клеток.

25. Способ по любому из вариантов осуществления 16-24, где одна или несколько клеток в биологическом образце содержат иммунцит.

26. Способ из варианта осуществления 25, где иммунцит представляет собой Т-клетку или клетку NK.

27. Способ из варианта осуществления 26, где Т-клетка представляет собой CD3+, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

28. Способ по любому из вариантов осуществления 1-27, где отделение проводят посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле или эксклюзионной хроматографии.

29. Способ по любому из вариантов осуществления 1-28, где отделение проводят посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле.

30. Способ оценки геномной интеграции последовательности трансгена, включающий:

(а) отделение, посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле, высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из популяции клеток, где указанная популяция клеток содержит множество модифицированных клеток, каждая из которых содержит, или как подозревают, содержит, последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок; и

(b) определение среднего или среднего арифметического количества копий на диплоидный геном или на клетку последовательности трансгена, интегрированного в геном множества модифицированных клеток из популяции клеток.

31. Способ из варианта осуществления 30, где, до отделения, полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, введен по меньшей мере в одну из множества модифицированных клеток из популяции клеток.

32. Способ из варианта осуществления 31, где популяция клеток не инкубирована при температуре более чем 25°C , необязательно, точно или приблизительно $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, в течение более чем 96 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, по меньшей мере в одну модифицированную клетку.

33. Способ из варианта осуществления 31, где популяция клеток не инкубирована при температуре более чем 25°C , необязательно, точно или приблизительно $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, в течение более чем 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, по меньшей мере в одну модифицированную клетку.

34. Способ из варианта осуществления 31, где популяция клеток не инкубирована при температуре более чем 25°C , необязательно, точно или приблизительно $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, в течение более чем 48 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, по меньшей мере в одну модифицированную клетку.

35. Способ по любому из вариантов осуществления 30-34, где популяция клеток криоконсервирована до отделения высокомолекулярной фракции ДНК.

36. Способ по любому из вариантов осуществления 1-35, где высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 15 тысяч пар оснований (т.п.о.).

37. Способ по любому из вариантов осуществления 1-35, где высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 17,5 тысяч пар оснований (т.п.о.).

38. Способ по любому из вариантов осуществления 1-35, где высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 20 тысяч пар оснований (т.п.о.).

39. Способ по любому из вариантов осуществления 1-38, где определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена проводят посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР).

40. Способ из варианта осуществления 39, где ПЦР представляет собой количественную полимеразную цепную реакцию (qПЦР), цифровую ПЦР или капельную цифровую ПЦР.

41. Способ из варианта осуществления 39 или варианта осуществления 40, где ПЦР представляет собой капельную цифровую ПЦР.

42. Способ по любому из вариантов осуществления 39-41, где ПЦР проводят с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части последовательности трансгена.

43. Способ по любому из вариантов осуществления 1-42, где определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества

копий последовательности трансгена на массу или вес ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, необязательно, на микрограмм ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток.

44. Способ из варианта осуществления 43, где определение количества последовательности трансгена включает оценку массы или веса последовательности трансгена в микрограммах, на микрограмм ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток.

45. Способ по любому из вариантов осуществления 1-42, где определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена на одну или несколько клеток, необязательно, на CD3+, CD4+ и/или CD8+ клетку, и/или на клетку, экспрессирующую рекомбинантный белок.

46. Способ по любому из вариантов осуществления 16-42, где определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена на диплоидный геном или на клетку в биологическом образце.

47. Способ из варианта осуществления 46, где количество копий представляет собой среднее или среднее арифметическое количество копий на диплоидный геном или на клетку среди одной или нескольких клеток в биологическом образце.

48. Способ по любому из вариантов осуществления 16-42, где определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена на объем биологического образца, необязательно, на микролитр или на миллилитр биологического образца.

49. Способ по любому из вариантов осуществления 16-42, где определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена на массу тела или площадь поверхности тела субъекта.

50. Способ по любому из вариантов осуществления 1-42, где определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции и нормализацию массы, веса или количества копий по массе, весу или количеству копий эталонного гена в высокомолекулярной фракции, или по стандартной кривой.

51. Способ из варианта осуществления 50, где эталонный ген представляет собой ген домашнего хозяйства.

52. Способ из варианта осуществления 50 или варианта осуществления 51, где эталонный ген представляет собой ген, кодирующий альбумин (ALB).

53. Способ из варианта осуществления 50 или варианта осуществления 51, где эталонный ген представляет собой ген, кодирующий субъединицу р30 белка рибонуклеазы Р (RPP30).

54. Способ из варианта осуществления 50-53, где количество копий эталонного гена в выделенной ДНК определяют посредством ПЦР с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части эталонного гена.

55. Способ по любому из вариантов осуществления 1-54, где последовательность трансгена не кодирует полный вирусный белок gag.

56. Способ по любому из вариантов осуществления 1-55, где последовательность трансгена не содержит полный геном HIV, компетентный по репликации вирусный геном, и/или вспомогательные гены, где вспомогательные гены, необязательно, представляют собой Nef, Vpu, Vif, Vpr и/или Vpx.

57. Способ по любому из вариантов осуществления 6-15, 24-29 и 31-55, где введение полинуклеотида проводят посредством трансдукции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид.

58. Способ из варианта осуществления 57, где вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор.

59. Способ из варианта осуществления 57 или варианта осуществления 58, где вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

60. Способ из варианта осуществления 57, где вирусный вектор представляет собой вектор AAV, необязательно, выбранный из числа векторов AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 или AAV8.

61. Способ по любому из вариантов осуществления 6-15, 24-29 и 31-55, где введение полинуклеотида проводят посредством способа физической доставки, необязательно, посредством электропорации.

62. Способ по любому из вариантов осуществления 1-61, где рекомбинантный белок представляет собой рекомбинантный рецептор.

63. Способ из варианта осуществления 62, где рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием, или антигеном, экспрессированным в клетках из окружения очага, ассоциированного с заболеванием или состоянием.

64. Способ из варианта осуществления 63, где заболевание или состояние представляет собой злокачественную опухоль.

65. Способ из варианта осуществления 63 или варианта осуществления 64, где антиген выбран из интегрин $\alpha\text{v}\beta 6$ (интегрин $\alpha\text{vb}6$), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, лиганда 1 хемокинов с мотивом C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора эпидермального фактора роста с мутацией типа III (EGFR vIII),

эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина В2, рецептора эфрина А2 (EPHa2), рецептора эстрогена, подобного рецептору Fc белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), связывающего фолат белка (FBP), рецептора альфа фолата, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G-белком рецептора, класса C, группы 5, члена D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, ассоциированного с меланомой высокомолекулярного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена вируса гепатита В, человеческого лейкоцитарного антигена А1 (HLA-A1), человеческого лейкоцитарного антигена А2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R α), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R α 2), рецептора, содержащего домен вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 из L1-CAM, члена А семейства 8, содержащего богатые лейцином повторы (LRRC8A), Lewis Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, мышинового цитомегаловируса (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов члена D группы 2 естественных киллеров (NKG2D), мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простатспецифического антигена, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простатспецифического мембранного антигена (PSMA), подобного рецепторной тирозинкиназе орфанного рецептора 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобластов (TPBG также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром-таутомераза, допахром-дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфического для патогена или экспрессируемого патогеном антигена, или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул, и/или молекул, экспрессируемых HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

66. Способ по любому из вариантов осуществления 62-65, где рекомбинантный рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор.

67. Способ по любому из вариантов осуществления 62-66, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

68. Способ из варианта осуществления 67, где CAR содержит внеклеточный узнающий антиген домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий ITAM.

69. Способ из варианта осуществления 68, где внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий ITAM, содержит внутриклеточный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ), необязательно, цепи CD3-дзета человека.

70. Способ из варианта осуществления 68 или варианта осуществления 69, где внутриклеточный передающий сигналы домен дополнительно содержит передающую костимулирующие сигналы область.

71. Способ из варианта осуществления 70, где передающая костимулирующие сигналы область содержит передающий сигналы домен из CD28 или 4-1BB, необязательно, CD28 человека или 4-1BB человека.

72. Способ оценки остаточной неинтегрированной последовательности трансгена, включающий:

(а) осуществление способа по любому из вариантов осуществления 1-15 и 28-71, для определения присутствия, отсутствия или количества последовательностей трансгена в высокомолекулярной фракции ДНК, таким образом, оценку геномной интеграции последовательности трансгена;

(b) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции;

(с) сравнение количества, определенного в (а), с количеством, определенным в (b), таким образом, определение количества остаточной неинтегрированной рекомбинантной последовательности.

73. Способ из варианта осуществления 72, где определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена включает определение массы, веса или количества копий последовательности трансгена на диплоидный геном или на клетку в одной или нескольких клетках.

74. Способ из варианта осуществления 72 или варианта осуществления 73, где одна или несколько клеток содержит популяцию клеток, в которой множество клеток из популяции содержат последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок.

75. Способ из варианта осуществления 74, где количество копий представляет собой среднее или среднее арифметическое количество копий на диплоидный геном или на клетку среди популяции клеток.

76. Способ по любому из вариантов осуществления 72-75, где сравнение количества копий включает вычитание количества копий, определенного в (а), из количества копий, определенного в (b).

77. Способ по любому из вариантов осуществления 72-75, где сравнение количества копий включает определение соотношения количества копий, определенного в (а) к количеству копий, определенному в (b).

78. Способ по любому из вариантов осуществления 72-77, где определение присутствия, отсутствия или количества в (b) проводят посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР).

79. Способ из варианта осуществления 78, где ПЦР представляет собой количественную полимеразную цепную реакцию (qПЦР), цифровую ПЦР или капельную цифровую ПЦР.

80. Способ из варианта осуществления 78 или варианта осуществления 79, где ПЦР представляет собой капельную цифровую ПЦР.

81. Способ по любому из вариантов осуществления 78-80, где ПЦР проводят с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части последовательности трансгена.

82. Способ по любому из вариантов осуществления 72-81, где определение присутствия, отсутствия или количества в (b) включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции и нормализацию массы, веса или количества копий по массе, весу или количеству копий эталонного гена в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции, или по стандартной кривой

83. Способ из варианта осуществления 72, где эталонный ген представляет собой ген домашнего хозяйства.

84. Способ из варианта осуществления 82 или варианта осуществления 83, где эталонный ген представляет собой ген, кодирующий альбумин (ALB).

85. Способ из варианта осуществления 82 или варианта осуществления 83, где эталонный ген представляет собой ген, кодирующий субъединицу р30 белка рибонуклеазы Р (RPP30).

86. Способ из варианта осуществления 82-85, где определение массы, веса или количества копий эталонного гена в выделенной ДНК проводят посредством ПЦР с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части эталонного гена.

87. Способ по любому из вариантов осуществления 72-86, где определение присутствия, отсутствия или количества в (a) и определение присутствия, отсутствия или количества в (b) проводят посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием одинакового праймера или одинакового набора праймеров.

88. Способ по любому из вариантов осуществления 72-87, где остаточная неинтегрированная рекомбинантная последовательность содержит одно или несколько из векторных плазмид, линейной комплементарной ДНК (кДНК), аутоинтегрантов или колец длинного концевой повтора (LTR).

VIII. ПРИМЕРЫ

[0493] Следующие примеры включены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1: Способ оценки количества копий интегрированного трансгена в клетках, модифицированных для экспрессии рекомбинантного белка, с использованием электрофореза в геле в пульсирующем поле

[0494] Исследовали использование электрофореза в геле в пульсирующем поле (PFGE) в качестве способа отделения высокомолекулярной ДНК в способах оценки количества копий вектора в клетках, трансдуцированных вирусным вектором, содержащим последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок.

[0495] Линию Т-клеток Jurkat трансдуцировали препаратом лентивируса, содержащего последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, в этом случае, химерный рецептор антигена (CAR). Клетки культивировали в течение 3 суток, и затем геномную ДНК выделяли из клеток. В качестве контроля, геномную ДНК выделяли из клеток, которые не были трансдуцированы лентивирусом, кодирующим последовательность трансгена, и к выделенной геномной ДНК добавляли известное количество плазмиды, кодирующей рекомбинантный белок, и неинтегрирующей вирусной упаковывающей плазмиды, кодирующей белок G вируса везикулярного стоматита Индиана (VSVg).

[0496] Образцы ДНК подвергали автоматизированному электрофорезу в геле в пульсирующем поле (PFGE) с использованием устройства BluePippin (Sage Science, Beverly, MA) для отделения высокомолекулярных молекул ДНК от низкомолекулярных, нехромосомных молекул ДНК ниже порога 15 т.п.о., 17,5 т.п.о. или 20 т.п.о.

[0497] Иллюстративные способы количественной полимеразной цепной реакции (qПЦР), такой как капельная цифровая ПЦР (кцПЦР), проводили для образца высокомолекулярной ДНК с использованием праймеров, специфических для последовательности, уникальной для последовательности трансгена («трансген»). Для сравнения, кцПЦР проводили также с использованием праймеров, специфических для кодирующих последовательностей VSVg («упаковывающая плазида») для детекции добавленной ДНК, которая, как ожидают, не интегрирует в хромосому клеток, или остаточных упаковывающих плазмид в трансдуцированных клетках, и с использованием праймеров, специфических для гена домашнего хозяйства, для детекции геномной ДНК во всех образцах (например, праймеров для гена, кодирующего субъединицу р30 белка рибонуклеазы Р (RRP30; «геномный контроль»). Праймеры, специфические для гена альбумина (ALB), использовали в качестве эталона для нормализации. Реакции проводили также для образцов ДНК, которые не подвергали PFGE (до геля). Для кцПЦР, образцы добавляли к смеси, содержащей каждый набор праймеров и зонды, капли получали с использованием генератора капель, полученные капли переносили в планшет для ПЦР, и амплификацию проводили в следующих условиях ПЦР: 95°C 10 мин; [94°C 30 с; 60°C 1 мин] x 39 циклов при скорости линейного изменения 2°C/с; 98°C 10 мин; и 4°C в течение неопределенного времени. После амплификации, сигнал от капель измеряли в считывателе капель. Количество копий каждого гена нормализовали по количеству диплоидных геномов (копий/диплоидный геном, с использованием амплификации с

использованием праймеров, специфических для гена альбумина (ALB), в качестве эталона) или на 50 нг геномной ДНК.

[0498] Как показано на **ФИГ. 1**, в нетрансдуцированном образце, содержащем добавленные кодирующую CAR плазмиду и упаковывающую плазмиду VSVg, последовательности трансгена и последовательности VSVg детектировали только в образцах, которые не подвергали PFGE (до геля). В отличие от этого, последовательности геномного контроля детектировали во всех образцах, подвергнутых PFGE для высокомолекулярной ДНК 15 т.п.о., 17,5 т.п.о. или 20 т.п.о. или выше. Этот результат показал, что при PFGE до амплификации ПЦР отделенной ДНК, достигали отделения от неинтегрированных плазмид с более низкой молекулярной массой.

[0499] В трансдуцированных образцах, последовательности трансгена детектировали как в образцах до PFGE (до геля), так и в образцах, подвергнутых PFGE, выше 15 т.п.о., 17,5 т.п.о. или 20 т.п.о. (**ФИГ. 1**, нижняя панель). Последовательность упаковывающей плазмиды VSVg обнаружена в образцах до геля и почти не поддавалась детекции в ДНК с более высокой молекулярной массой. Не ожидали, что эти последовательности, которые, возможно, происходят из остаточных плазмидных последовательностей при получении вируса, интегрировали в геном клеток. Геномную ДНК, включая хромосомную ДНК, также детектировали во всех образцах: наблюдали, что количество копий гена домашнего хозяйства RRP30 составляло приблизительно 2 копии на диплоидный геном во всех образцах.

[0500] Анализ, включающий PFGE, позволял детекцию интегрированных или геномных последовательностей, с удалением в то же время неинтегрированных, низкомолекулярных молекул нуклеиновой кислоты. Таким образом, результаты показывают, что применение PFGE для отделения высокомолекулярной ДНК, до амплификации ПЦР последовательностей трансгена из выделенной ДНК, можно использовать в качестве анализа количества интегрированных копий вектора (iVCN) для облегчения специфического определения количества копий последовательностей трансгена, интегрированных в геном.

Пример 2: Сравнение количества копий трансгена, оцененного посредством капельной цифровой ПЦР (кцПЦР), с использованием или без использования электрофореза в геле в пульсирующем поле (PFGE), в различных временных точках в ходе способа получения клеток

[0501] Способ iVCN, описанный в примере 1, включающий отделение высокомолекулярных молекул посредством PFGE до анализа количества копий вектора посредством qПЦР, использовали для оценки количества интегрированных копий иллюстративных последовательностей трансгена, кодирующих химерный рецептор антигена (CAR), в различных временных точках в ходе способа модификации клеток, как в линии Т-клеток Jurkat, так и в первичных Т-клетках. Способ сравнивали со стандартным анализом количества копий вектора (VCN), который не включает разделение высоко- и

низкомолекулярных молекул ДНК посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле (PFGE).

[0502] Для исследований, геномную ДНК получали из клеток и подвергали оценке количества копий последовательностей трансгена посредством либо (1) способа iVCN, в общем, как описано в примере 1 выше, с использованием порогового значения для отделения >15 т.п.о. («iVCN») и устройства PippinHT (Sage Science, Beverly, MA), либо (2) стандартного способа VCN, в котором геномную ДНК сначала не разделяли посредством PFGE («VCN»). В обоих анализах, количество копий трансгена определяли посредством кцПЦР с использованием праймеров, специфических для последовательности, уникальной для трансгена, и нормализовали по диплоидному геному, как определено с использованием праймеров, специфических для эталонного гена (например, гена альбумина (ALB)).

А. Линия клеток Jurkat

[0503] Т-клетки Jurkat трансдуцировали препаратом лентивируса, содержащим последовательности трансгена, кодирующие CAR, в общем, как описано в примере 1 выше. Образцы клеток получали до трансдукции («до»), через 5 минут, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа и 96 часов после трансдукции, и использовали для анализа количества копий трансгена.

[0504] Как показано на **ФИГ. 2А**, оценка количества копий трансгена с использованием PFGE для детекции количества интегрированных копий (iVCN) в геноме в различных временных точках в способе модификации клеток Jurkat показала, что интеграция трансгена не поддавалась детекции до приблизительно 6 часов в этих клетках, и увеличивалась до приблизительно 48 часов, времени, в которое детектированное количество копий, как правило, достигало плато. В отличие от этого, оценка количества копий трансгена без PFGE, дектирующая количество копий трансгена в клетках посредством стандартного способа VCN, показала значительную детекцию последовательности трансгена, начиная в намного более ранних временных точках. Это наблюдение согласовывалось с детекцией неинтегрирующих последовательностей трансгена посредством стандартного способа VCN, таких как продуцирующие плазмиды, линейная или кольцевая комплементарная ДНК (кДНК) или аутоинтегранты, в этих ранних временных точках после модификации клетки. Количество копий трансгена, как определено без PFGE, позднее уменьшалось до уровней, сходных с уровнями, детектированными посредством оценки iVCN количества интегрированных копий (с PFGE) около 96 часов, показывая, что хотя интеграция трансгена являлась полной через приблизительно 48 часов, стандартный способ VCN без PFGE не являлся точным до приблизительно 96 часов или более после трансдукции в этих клетках.

В. Модификация первичных клеток

[0505] Первичные Т-клетки от субъектов-людей модифицировали для экспрессии CAR с использованием иллюстративного способа модификации. Отдельные композиции CD4+ и CD8+ клеток отбирали из выделенных РВМС из образца после лейкофереза, и

отобранные композиции клеток криоконсервировали. Отдельные композиции CD4+ и CD8+ Т-клеток впоследствии размораживали и смешивали в соотношении 1:1 жизнеспособных CD4+ Т-клеток к жизнеспособным CD8+ Т-клеткам. Приблизительно 300×10^6 Т-клеток (150×10^6 CD4+ и 150×10^6 CD8+ Т-клеток) из смешанной композиции стимулировали в присутствии парамагнитных покрытых полистиролом бусин с присоединенными антителами против CD3 и против CD28 в соотношении 1:1 бусин и клеток в бессывороточных средах, содержащих рекомбинантные IL-2, IL-7 и IL-15, в течение между 18 и 30 часами.

[0506] После инкубации, приблизительно 100×10^6 жизнеспособных клеток из стимулированной композиции клеток промывали и ресуспендировали в бессывороточных средах, содержащих рекомбинантные IL-2, IL-7 и IL-15. Клетки трансдуцировали препаратом лентивируса, кодирующего CAR против BCMA, посредством спинокуляции при приблизительно 1600 g в течение 60 минут. После спинокуляции, клетки промывали и ресуспендировали в бессывороточных средах, содержащих рекомбинантные IL-2, IL-7 и IL-15, и инкубировали в течение приблизительно 18-30 часов при приблизительно 37°C. CAR против BCMA содержал антигенсвязывающий домен scFv, специфический для BCMA, трансмембранную область CD28, передающую костимулирующие сигналы область 4-1BB и происходящий из CD3-дзета внутриклеточный передающий сигналы домен.

[0507] Затем клетки культивировали для размножения посредством переноса в биореактор (например, биореактор с качательным движением) в приблизительно 500 мл сред, содержащих двойную концентрацию цитокинов, по сравнению с используемой в ходе стадий инкубации и трансдукции. Когда достигали установленной плотности жизнеспособных клеток, начинали перфузию, где среду заменяли посредством полунепрерывной перфузии при постоянном перемешивании. Клетки культивировали в биореакторе, пока не достигали порогового количества клеток (TNC) приблизительно 3×10^9 клеток, что, как правило, происходило в способе, включающем 6-7 суток размножения. Конъюгированные с антителом против CD3 и против CD28 парамагнитные бусины удаляли из композиции клеток посредством воздействия магнитного поля. Затем клетки собирали и составляли с криопротектором.

[0508] Для анализа ДНК посредством способов iVCN и стандартного VCN, как описано выше, образцы клеток получали до трансдукции («до»), через 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 120 часов после трансдукции и по завершению способа модификации («завершение»).

[0509] Как показано на **ФИГ. 2В**, количество копий трансгена, как определено после PFGE (iVCN), не было детектировано до приблизительно 24 часов после трансдукции и увеличивалось до приблизительно 48-72 часов. В анализе без PFGE (VCN), количество копий трансгена было намного выше в ранних временных точках (24 и 48 часов), но позже уменьшалось до уровней, сходных с уровнями, детектированными посредством оценки количества интегрированных копий (iVCN) около 96 часов. В обоих

анализах, оцененное количество копий являлось сходным в образцах, полученных через 96 часов или дольше после трансдукции.

[0510] Результаты подтверждают, что оценка количества копий вектора с PFGE (iVCN) выявила согласованную зависимость от времени интеграции трансгена во временных точках после трансдукции. Наблюдения, кроме того, показали, что оценка посредством стандартных способов VCN, которые не включают PFGE, может детектировать последовательности трансгена в клетках в периоды времени до того, как произошла интеграция в геном, и таким образом, показали, что стандартные способы VCN могут не являются полностью подходящими для оценки количества копий вектора для образцов менее чем через 4 суток после трансдукции.

Пример 3: Оценка количества копий интегрированного трансгена с использованием электрофореза в геле в пульсирующем поле (PFGE) в ходе различных не включающих размножения способов получения

[0511] Количество копий трансгенов, кодирующих химерный рецептор антигена (CAR), оценивали с использованием способов iVCN и VCN в общем, как описано в примерах 1 и 2, в различных временных точках в ходе иллюстративных способов получения композиции генетически модифицированных Т-клеток. Иллюстративные способы не включали стадию размножения после трансдукции, и отличались по стимулирующему реагенту, культуральным средам и периодам времени сбора.

[0512] Для каждого способа, отдельные композиции CD4+ и CD8+ первичных Т-клеток человека отбирали у двух различных субъектов-людей (донора А и донора В) из выделенных РВМС из образцов человека после лейкофереза. Отобранные клетки криоконсервировали, впоследствии размораживали и смешивали в соотношении 1:1 жизнеспособных CD4+ Т-клеток и жизнеспособных CD8+ Т-клеток. Смешанную композицию клеток стимулировали посредством инкубации со следующим стимулирующим реагентом: (1) конъюгированные с антителом против CD3/против CD28 парамагнитные бусины («бусины»), (2) реагенты Fab против CD3/против CD28, конъюгированные с олигомерным мутеином стрептавидина в концентрации 4,0 мкг на 10^6 клеток, или (3) реагенты Fab против CD3/против CD28, конъюгированные с олигомерным мутеином стрептавидина, в концентрации 0,8 мкг на 10^6 клеток. Инкубацию проводили в бессывороточных средах с рекомбинантными цитокинами в течение приблизительно 18-30 часов.

[0513] Затем клетки промывали и трансдуцированы посредством спинокуляции с препаратом лентивируса, содержащим последовательности трансгена, кодирующие CAR. Затем клетки инкубировали с базовыми средами без сыворотки, факторов роста или рекомбинантных цитокинов («базовая») или бессывороточными средами, содержащими рекомбинантные цитокины IL-2, IL-5 и IL-15 («полная»). После 96 часов после начала инкубации с реагентом на бусинах, клетки подвергали воздействию магнитного поля для удаления парамагнитных бусин. Через 24 часа, 48 часов или 96 часов после начала инкубации с олигомерным стимулирующим реагентом, клетки подвергали воздействию

биотина в течение 10 минут для диссоциации и удаления олигомерных стрептавидиновых реагентов. Клетки промывали и составляли с криопротектором.

[0514] Клетки размораживали, и геномную ДНК получали из собранных клеток. Для оценки количества копий трансгена, кцПЦР с использованием праймеров, специфических для последовательности трансгена, проводили для ДНК, которую подвергали PFGE для высокомолекулярной фракции >15 т.п.о., как описано в примерах 1 и 2 выше. Образцы клеток также оценивали посредством проточной цитометрии, окрашивая по экспрессии CAR, CD3 и активированной каспазы 3 (aCas3).

[0515] Результаты показаны на **ФИГ. 3А-3В**. Как показано на **ФИГ. 3А**, для клеток, стимулированных с использованием олигомерного реагента, количество копий интегрированного трансгена, измеренное посредством iVCN, увеличивалась в образцах, в которых инкубацию проводили в течение 24 часов или 48 часов после начала стимуляции, но не увеличивалось далее. Количество копий трансгена, как измерено посредством стандартного VCN (без PFGE), оставалось значительно выше, чем количество интегрированных копий трансгена, как измерено посредством iVCN, приблизительно до 96 часов после начала стимуляции. Этот результат согласовывался с наблюдением, что стандартный способ VCN (без PFGE) не являлся точным до временной точки 96 часов в этом способе. Для клеток, стимулированных с использованием реагента на бусинах, через 96 часов, более высокое количество интегрированных копий наблюдали для клеток, инкубированных с базовыми средами, по сравнению с клетками, инкубированными с полными средами. Как показано на **ФИГ. 3В**, количество интегрированных копий трансгена коррелировало с процентом экспрессирующих CAR клеток (как определено посредством процента CD3+/активированная Cas3-/CAR+ клеток среди CD3+ клеток посредством проточной цитометрии). Этот результат дополнительно поддерживает полезность анализа iVCN для оценки количества интегрированных копий, особенно при оценке вклада различных параметров, включая время инкубации, среды или реагенты, в способ модификации клеток.

Пример 4: Сравнение количества интегрированных и неинтегрированных копий трансгена, оцененного посредством капельной цифровой ПЦР (кцПЦР) с использованием или без использования электрофореза в геле в пульсирующем поле (PFGE), в ходе различных способов получения клеток

[0516] Количество интегрированных и неинтегрированных трансгенов, кодирующих химерный рецептор антигена (CAR), оценивали посредством кцПЦР для образцов ДНК, с использованием или без использования электрофореза в геле в пульсирующем поле (PFGE), полученных в ходе различных иллюстративных способов получения композиции генетически модифицированных Т-клеток.

А. Иллюстративные способы модификации Т-клеток

[0517] Иллюстративные способы включали способы, в которых модифицированные клетки подвергали размножению клеток (включающий размножение

способ) и способы, в которых клетки не размножали (не включающий размножения способ).

1) Включающий размножение способ - бусины с антителом против CD3/антителом против CD28

[0518] Осуществляли включающий размножение способ, в общем, как описано в примере 2.В.

2) Не включающий размножения способ - бусины с антителом против CD3/антителом против CD28

[0519] Не включающий размножения способ с использованием бусин, конъюгированных с антителом против CD3/против CD28, проводили подобно тому, как описано в примере 3. CD4+ и CD8+ Т-клетки отбирали и смешивали в соотношении 1:1 для получения входной композиции, содержащей приблизительно 600×10^6 Т-клеток (300×10^6 CD4+ и 300×10^6 CD8+ Т-клеток). Смешанную входную композицию клеток стимулировали посредством инкубации клеток в течение 18-30 часов в присутствии бусин, конъюгированных с антителом против CD3/против CD28, в соотношении 1:1 бусин и клеток в бессывороточных средах, содержащих рекомбинантные IL-2, IL-7 и IL-15. После стимуляции, клетки промывали и ресуспендировали в бессывороточных средах, содержащих рекомбинантные IL-2, IL-7 и IL-15. Затем клетки трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим такой же CAR против BCMA, как использованный во включающем размножение способе, посредством спинокуляции при приблизительно 693 g в течение 30 минут.

[0520] В одной группе, после спинокуляции, клетки ресуспендировали в базовых средах без сыворотки и без добавленных факторов роста или рекомбинантных цитокинов (базовые среды) и позволяли инкубацию при приблизительно 37,0°C в инкубаторе в течение приблизительно 96 часов после начала стимуляции с бусинами с антителом против CD3/антителом против CD28. В другой группе, осуществляли сходный способ, за исключением того, что после спинокуляции клетки ресуспендировали в базовых средах без добавленных факторов роста или рекомбинантных цитокинов (базовые среды) и позволяли инкубацию при приблизительно 37,0°C в инкубаторе в течение приблизительно 72 часов после начала стимуляции с бусинами с антителом против CD3/антителом против CD28.

3) Не включающий размножения способ - олигомерный реагент Fab против CD3/против CD28

[0521] Не включающий размножения способ с использованием олигомерного реагента Fab против CD3/против CD28 осуществляли подобно тому, как описано в примере 3. CD4+ и CD8+ Т-клетки отбирали и смешивали в соотношении 1:1 для получения входной композиции, содержащей приблизительно 600×10^6 Т-клеток (300×10^6 CD4+ и 300×10^6 CD8+ Т-клеток). Клетки из смешанной входной композиции клеток стимулировали посредством инкубации с 480 мкг (или 0,8 мкг на 1×10^6 клеток) реагентов Fab против CD3/против CD28, конъюгированных с олигомерным мутеином

стрептавидина, полученных, как описано в примере 2, которую проводили в бессывороточных средах, содержащих рекомбинантные IL-2, IL-7 и IL-15 в течение между 18-30 часов. После стимуляции, клетки трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим такой же CAR против BCMA, как использованный во включающем размножение способе, посредством спинокуляции при 693 g в течение 30 минут.

[0522] В одной группе способа, после спинокуляции, клетки промывали и ресуспендировали в базовых средах без сыворотки, добавленных факторов роста или рекомбинантных цитокинов (базовые среды), и инкубировали при приблизительно 37,0°C в инкубаторе. Приблизительно через 24 часа после начала трансдукции (приблизительно через 48 часов после начала стимуляции), 1,0 mM D-биотина добавляли в ходе инкубации и перемешивали с клетками для диссоциации реагентов Fab против CD3 и против CD28 от олигомерных стрептавидиновых реагентов. Клетки далее инкубировали в течение приблизительно 48 часов (96 часов после начала стимуляции), и затем промывали и составляли с криопротектором.

[0523] В другой группе способа, после спинокуляции, клетки промывали и ресуспендировали в базовых средах без сыворотки, добавленных факторов роста или рекомбинантных цитокинов (базовые среды) и инкубировали при приблизительно 37,0°C в инкубаторе. Приблизительно через 24 часа после начала трансдукции, 1,0 mM D-биотина добавляли в ходе инкубации и перемешивали с клетками для диссоциации реагентов Fab против CD3 и против CD28 от олигомерного стрептавидинового реагента. Клетки далее инкубировали в течение дополнительных 24 часов (72 часа после начала стимуляции), и затем промывали и составляли с криопротектором.

4) Обобщение способов

[0524] В таблице E1 обобщены признаки способов, как описано выше, в дополнение к способу с использованием ложного пустого вектора.

Таблица E1: Обобщение способов						
Группа	Стим. реагент	Количество клеток	Трансдукция	Размножение	Удаление стимулирующего реагента	Сбор
1	Бусины	1,5×10 ⁶ CD4 и 1,5×10 ⁶ CD8	Спинокуляция и инкубация в течение 18-30 часов	До TNC ~ 3×10 ⁹ клеток, приблизительно 6-7 суток	Промывка и удаление бусин	После удаления бусин
					Сутки после порогового количества	
2	Бусины	3,0×10 ⁶ CD4 и 3,0×10 ⁶ CD8	Спинокуляция и инкубация в течение приблизительно 72 часов в базовых средах	Нет	Промывка и удаление бусин	После удаления бусин
					Приблизительно через 96 часов после начала стимуляции	
3	Бусины	3,0×10 ⁶ CD4 и 3,0×10 ⁶	Спинокуляция и инкубация в течение	Нет	Промывка и удаление бусин	После удаления бусин

		CD8	приблизительно 48 часов в базовых средах		Приблизительно через 72 часа после начала стимуляции	
4	Олигомер 0,2X	$3,0 \times 10^6$ CD4 и $3,0 \times 10^6$ CD8	Спинокуляция и инкубация в течение 72 часов в базовых средах	Нет	Биотин, добавленный в ходе инкубации приблизительно через 24 часа после стимуляции	96 часов после начала стимуляции
5	Олигомер 0,2X	$3,0 \times 10^6$ CD4 и $3,0 \times 10^6$ CD8	Спинокуляция и инкубация в течение 48 часов в базовых средах	Нет	Биотин, добавленный в ходе инкубации приблизительно через 24 часа после начала стимуляции	72 часа после начала стимуляции
6	(Ложный) Олигомер 0,2X	$1,5 \times 10^6$ CD4 и $1,5 \times 10^6$ CD8	Ложная трансдукция и статическая инкубация в течение 24 часов в полных средах	Нет	Биотин, добавленный приблизительно через 24 часа после начала стимуляции	96 часов после начала стимуляции

В. Оценка количества копий трансгена

[0525] Клетки размораживали, и геномную ДНК получали из собранных клеток. Для оценки количества копий интегрированного трансгена, кцПЦР с использованием праймеров, специфических для последовательности трансгена, проводили для ДНК, которую подвергали PFGE для высокомолекулярной фракции > 10 т.п.о. в общем, как описано в примерах 1 и 2 («iVCN»). Для сравнения, кцПЦР с использованием праймеров, специфических для последовательности трансгена, также проводили для ДНК, которую не подвергали PFGE («VCN», как высоко-, так и низкомолекулярная ДНК). Образцы клеток также оценивали посредством проточной цитометрии.

[0526] Результаты показаны на **ФИГ. 4А-4Е**. Как показано на **ФИГ. 4А**, в каждом из более коротких не включающих размножения способов получали клетки, для которых показано количество копий, как определено посредством VCN (без PFGE), которое было выше, чем количество копий, как определено посредством iVCN (с PFGE), что показывает, что неинтегрированные последовательности трансгена присутствовали в образцах, модифицированных посредством этих более коротких способов. Доля интегрированного трансгена, которую определяли посредством деления количества копий с использованием iVCN на VCN, была значительно ниже в клетках, полученных с использованием не включающих размножения способов (**ФИГ. 4В**). Подобным образом, доля неинтегрированного трансгена, которую определяли как 1 - доля интегрированного трансгена, являлась значительно выше в клетках, полученных с использованием не включающих размножения способов (**ФИГ. 4С**). Как показано на **ФИГ. 4D**, количество копий неинтегрированного трансгена, определенное посредством вычитания iVCN из

VCN, составляло между приблизительно 0,8 и 1,3 в среднем, в клетках, полученных с использованием более коротких способов. С использованием стандартного VCN без PFGE, количество копий трансгена на CAR+ клетку показано на **ФИГ. 4Е**. Эти результаты дополнительно поддерживают полезность способа iVCN для оценки количества копий интегрированного и неинтегрированного трансгена в способе модификации клеток.

Пример 5: Сравнение количества интегрированных и неинтегрированных копий трансгена в ходе различных включающих размножение способов получения клеток

[0527] Количество копий трансгена в ДНК с использованием или без использования электрофореза в геле в пульсирующем поле (PFGE), оценивали посредством кцПЦР в различных временных точках в способе генетической инженерии Т-клеток, включающем стадию размножения клеток после трансдукции.

[0528] Первичные Т-клетки от различных доноров-людей модифицировали для экспрессии CAR, как описано в примере 2.В. Образцы получали ежедневно, начиная от суток 0 до суток 8 включающего размножения способа, включая в размороженном материале (ТМАТ; сутки 0), при активации (АМАТ; сутки 1), при трансдукции (ХМАТ; сутки 2) или в различные периоды времени после начала культивирования для размножения клеток (інос+1 - інос+6; представляющие сутки 3-8 способа). Геномную ДНК получали из образцов клеток. Для оценки количества копий интегрированного трансгена, кцПЦР с использованием праймеров, специфических для последовательности трансгена, проводили для ДНК, которую подвергали PFGE для высокомолекулярной фракции, как описано в примерах 1 и 2 («iVCN»). Для сравнения, кцПЦР с использованием праймеров, специфических для последовательности трансгена, также проводили для ДНК, которую не подвергали PFGE («VCN», как высоко-, так и низкомолекулярная ДНК). Количество копий неинтегрированного трансгена, долю интегрированного трансгена и долю неинтегрированного трансгена также определяли, в общем, как описано в примере 4 выше.

[0529] Репрезентативные результаты показаны на **ФИГ. 5**. Как показано, на сутки трансдукции или в ранних временных точках после трансдукции (например, інос+1, інос+2), количество копий, как определено посредством стандартного способа VCN, определенное для образцов геномной ДНК, не подвергнутой PFGE, включало значительную долю неинтегрированных трансгенов. В более поздних временных точках после трансдукции, количество копий, как определено посредством iVCN (с PFGE) и стандартного VCN (без PFGE), являлось приблизительно одинаковым, показывая, что неинтегрированные копии трансгена больше не присутствовали в клетках в этих временных точках.

Пример 6: Оценка интеграции трансгена в фибробластах

[0530] Интеграцию трансгена, введенного в линию клеток фибробластов посредством лентивирусной трансдукции, оценивали посредством анализа количества

копий трансгена посредством кцПЦР в геномной ДНК, которую подвергали электрофорезу в геле в пульсирующем поле (PFGE).

[0531] Линию клеток фибросаркомы человека HT1080 (ATCC® CCL-121™) трансдуцировали препаратом лентивируса, содержащего последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, в этом случае, химерный рецептор антигена (CAR). После трансдукции клетки культивировали и собирали через 12, 24, 48 или 72 часа после трансдукции. Геномную ДНК получали из собранных клеток. Количество копий трансгена определяли посредством кцПЦР с использованием праймеров, специфических для трансгена, в образцах высокомолекулярной ДНК после PFGE («iVCN») и в образцах ДНК, которые не подвергали PFGE («VCN», как высоко-, так и низкомолекулярная ДНК), в общем, как описано в примерах 1 и 2 выше.

[0532] Как показано на **ФИГ. 6**, интеграция трансгена в линию клеток фибробластов HT1080 завершалась через 24 часа после трансдукции. Время полной интеграции в линию клеток фибробластов было быстрее, чем наблюдали в Т-клетках, включая клетки Jurkat и первичные Т-клетки человека, как показано в примерах выше. Этот результат выявил, что определенные типы клеток подвергаются более быстрой интеграции лентивируса в геном клеток.

Пример 7: Оценка экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток для определения количества последовательности трансгена и фармакокинетических параметров введенных модифицированных Т-клеток

[0533] Иллюстративный способ, включающий кцПЦР и PFGE, используют для оценки количества последовательности трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, такой как химерный рецептор антигена (CAR), у субъекта, которому введены модифицированные Т-клетки.

[0534] Субъектам, которые имеют заболевание или нарушение, такое как пролиферативное заболевание или нарушение, например, злокачественную опухоль, вводят модифицированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, который может нацеливаться на конкретный антиген, экспрессированный клетками, ассоциированными с заболеванием или нарушением, такими как клетки злокачественных опухолей. В некоторых примерах, рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR), который является специфическим для антигена злокачественной опухоли, такого как антиген, экспрессированный или ассоциированный с клетками злокачественных опухолей. В некоторых аспектах, терапевтические композиции Т-клеток получают посредством введения последовательностей трансгена, кодирующего рекомбинантный рецептор, в выделенные первичные Т-клетки человека, такие как выделенные первичные CD4+ и/или CD8+ Т-клетки человека, например, с использованием включающего размножение или не включающего размножения способа, как описано в примерах 1-6 выше. Субъектам вводят терапевтическую композицию Т-клеток, содержащую модифицированные клетки.

[0535] В различных временных точках после введения композиции клеток, количество последовательностей трансгена, присутствующих в биологических образцах от субъекта, которому введены модифицированные клетки, определяют с использованием способов, как описано в настоящем описании, для оценки количества интегрированных копий трансгена. В некоторых аспектах, клетки в образце крови или сыворотки, или органа, или ткани (например, в пораженном заболеванием участке, например, в образце опухоли) субъекта получают, до, во время и/или после введения терапевтической композиции Т-клеток. Геномную ДНК получают из образцов. В некоторых аспектах, количество последовательностей трансгена, присутствующих в биологическом образце, определяют посредством кцПЦР с использованием праймеров, которые могут специфически амплифицировать часть трансгена, из высокомолекулярных образцов ДНК после PFGE («iVCN»), в общем, как описано в примерах 1 и 2 выше. В некоторых аспектах, количество копий также оценивают посредством кцПЦР с использованием таких же праймеров, из образцов ДНК, которые не подвергали PFGE («VCN», как высоко-, так и низкомолекулярная ДНК). В некоторых аспектах, образцы клеток, в некоторых случаях, можно также оценивать посредством проточной цитометрии, окрашивания по экспрессии рекомбинантного белка, например, CAR, для определения доли клеток в образце, экспрессирующих рекомбинантный белок, например, CAR.

[0536] В некоторых примерах, количество последовательностей трансгена в биологическом образце количественно оценивают как копий интегрированного трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, например, CAR, на количество ДНК, такое как микрограмм ДНК, или на объем образца, такой как микролитр образца, например, крови или сыворотки, или на общее количество клеток, например, на тотальные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) или лейкоциты, или Т-клетки, необязательно, на объем, например, на микролитр образца, или на клетку, например, на диплоидный геном Т-клетки, или на экспрессирующую CAR клетку, необязательно, на объем, например, на микролитр образца. Иллюстративные фармакокинетические (PK) параметры, которые можно определять, на основании способа iVCN или посредством других способов, таких как проточная цитометрия, включают максимальные (пиковые) концентрации в плазме ($C_{\text{макс.}}$) последовательностей трансгена или конкретных клеток, экспрессирующих рекомбинантный белок, например, $C_{\text{макс.}}$ CD3⁺ CAR⁺ клеток, CD4⁺ CAR⁺ клеток и/или CD8⁺ CAR⁺ Т-клеток; временную точку, в которой достигают $C_{\text{макс.}}$ ($T_{\text{макс.}}$), например, $T_{\text{макс.}}$ последовательностей трансгена, CD3⁺ CAR⁺ клеток, CD4⁺ CAR⁺ клеток и/или CD8⁺ CAR⁺ Т-клеток, и/или площадь под кривой (AUC) для конкретного времени после введения, например, AUC₀₋₂₈, последовательностей трансгена, CD3⁺ CAR⁺ клеток, CD4⁺ CAR⁺ клеток и/или CD8⁺ CAR⁺ Т-клеток.

Пример 8: Корреляция стандартного анализа VCN и анализа iVCN с поверхностной экспрессией рекомбинантного рецептора в ходе способов получения клеток

[0537] Анализы количества копий вектора (VCN) и iVCN, описанные выше, использовали для определения количества копий трансгена, кодирующего рекомбинантный рецептор, например, химерный рецептор антигена (CAR), введенный в Т-клетки посредством лентивирусной трансдукции, и результаты коррелировали с поверхностной экспрессией CAR. В этом исследовании, анализы проводили для композиций клеток, полученных из первичных Т-клеток от различных доноров-людей, модифицированных для экспрессии CAR с использованием либо включающего размножение способа, в общем, как описано в примере 2.В, либо не включающего размножения способа, в общем, как описано в примере 4.А.3, с модификацией, в которой клетки активировали с использованием реагента Fab против CD3/против CD28, конъюгированного с олигомерным мутеином стрептавидина, с последующими трансдукцией и короткой инкубацией в базовых средах, которые не включали добавления рекомбинантных цитокинов (свободные от цитокинов среды), перед сбором.

[0538] Геномную ДНК получали из образцов клеток в конце способа модификации в укороченном, не включающем размножения способе или во включающем размножение способе. Анализы VCN и iVCN проводили, как описано в примерах 1, с использованием порогового значения для отделения >15 т.п.о. («iVCN») и устройства PippinHT (Sage Science, Beverly, MA), или (2) стандартного способа VCN, в котором геномную ДНК сначала не отделяли посредством PFGE («VCN»).

[0539] Результаты показали, что количество копий трансгена, оцененное с использованием анализа VCN, в общем коррелировало с количеством копий трансгена, оцененным посредством iVCN (**ФИГ. 7А**). Однако, для клеток, полученных с использованием не включающего размножения способа, значения, полученные посредством VCN, были выше, чем значения, полученные посредством iVCN, что согласуется с детекцией в анализе VCN неинтегрированных последовательностей трансгена, которые могли присутствовать в образцах, содержащих клетки, полученные с использованием не включающего размножения способа. В отличие от этого, для клеток, полученных с использованием включающего размножение способа, значения, полученные посредством VCN и iVCN, являлись почти идентичными (около линии VCN=iVCN). Эти различия, вероятно, обусловлены присутствием большего количества свободных, неинтегрированных копий последовательностей трансгена в образцах в более коротком не включающем размножения способе, по сравнению с включающим размножение способом. Эти результаты согласовывались с наблюдением, что стандартный анализ VCN, способный к детекции как высоко-, так и низкомолекулярной ДНК, имеет ограничения, по сравнению с анализом iVCN, в частности, при использовании для оценки клеток в раннее время после введения трансгена, например, в укороченном способе модификации Т-клеток, где свободные, неинтегрированные копии последовательностей трансгена все еще могут присутствовать в образце.

[0540] Для оценки степени корреляции анализа iVCN или VCN с поверхностной экспрессией CAR, образцы клеток из не включающего размножения или включающего

размножение способа оценивали посредством проточной цитометрии по экспрессии CD3, CD45 и CAR для определения процента CD3+CAR+ клеток среди жизнеспособных CD45+ клеток. Как показано на **ФИГ. 7В**, анализ VCN показал лучшую корреляцию с процентом CAR+ клеток для образцов, модифицированных посредством включающего размножение способа, чем посредством не включающего размножения способа, вероятно, из-за присутствия неинтегрированных последовательностей ДНК CAR, которые не вносили вклад в поверхностную экспрессию CAR. Как показано на **ФИГ. 7С**, для iVCN показана сходная корреляция с экспрессией CAR среди клеток, модифицированных посредством либо не включающего размножения, либо включающего размножение способа. Для всех образцов, корреляция экспрессии CAR с количеством копий на клетку была выше для анализа iVCN ($R^2=0,8952$), по сравнению с количеством копий на клетку, как определено посредством анализа VCN ($R^2=0,5903$).

[0541] Результаты поддерживают полезность анализа iVCN для точного определения количества копий стабильно интегрированной последовательности трансгена, в частности, для клеток, полученных с использованием не включающего размножения способа, которые могут сохранять свободные, неинтегрированные копии последовательностей трансгена. Анализ VCN, который не различает интегрированные и неинтегрированные последовательности трансгена, имеет ограничения для точного определения количества стабильно интегрированных последовательностей трансгена, особенно в ходе и после более короткого, не включающего размножения способа.

[0542] Настоящее изобретение не ограничено по объему конкретными описанными вариантами осуществления, которые представлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов очевидны из описания и объяснений в настоящем описании. Такие варианты могут быть осуществлены на практике без отклонения от объема и содержания описания, и включены в объем настоящего описания.

Последовательности

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
1	ESKYGPPCPPCP	спейсер (шарнир IgG4) (ак) Homo sapiens
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	спейсер (шарнир IgG4) (н.) Homo sapiens
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Шарнир-CH3 спейсер, Homo sapiens
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE	Шарнир-CH2- CH3 спейсер, Homo sapiens

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
	PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK	
5	RWPESPKAQASSVPTAQPPAQEGSLAKATTAPATTRNTGR GGEEKKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLW LRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHS NGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPA AQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQ REVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCV VSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH	IgD-шарнир-Fc, Homo sapiens
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A, искусственная
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINA TNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRGDSFHTHPPLDPQELDILKTVK EITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNI TSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKII SNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRE CVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDN CIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLC HPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIG LFM	tEGFR, искусственная
8	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 153-179 из No. доступа P10747), Homo sapiens
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 114-179 из No. доступа P10747), Homo sapiens
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RS	CD28 (аминокислоты 180-220 из P10747), Homo sapiens
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRS	CD28 (LL на GG), Homo sapiens
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC	4-1BB (аминокислоты

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
	EL	214-255 из Q07011.1), Homo sapiens
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3-дзета, Homo sapiens
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3-дзета, Homo sapiens
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3-дзета, Homo sapiens
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIGDLHILPVA FRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNK NLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCS PEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSEC IQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGV MGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	EGFR, искусственная
17	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A, искусственная
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGGG)5-P-, где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин, и S представляет собой серин	Линкер
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	Линкер
24	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctcctgatcc ca	GMCSFR, альфа-цепь, сигнальная последовательность
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFR, альфа-цепь, сигнальная последовательность
26	MALPVTALLPLALLHA	CD8-альфа,

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
		сигнальный пептид
27	EVQLVQSGAEMKKPGASLKLSCASGYTFIDYYVYWMR QAPGQGLES MGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYM ELSR LRSDDTAMYYCARSQRDGYMDYWGQGTLVTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) антитела против BCMA
28	QSALTQPASVSASPGQSIAISCTGTSSDVGWYQQHPGKAP KLMIYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS SNTRSSTLVFGGGTKLTVLG	Варибельная легкая цепь (VL) антитела против BCMA
29	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	линкер
30	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRA PGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQIN NLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGSTVTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) антитела против BCMA
31	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQ QKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDD VAVYYCLQSR TIPRTFGGGTKLEIK	Варибельная легкая цепь (VL) антитела против BCMA
32	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFTNFGMNWVK QAPGKGFKWMAWINTYTGESYFADDFKGRFAFSVETSATTAYL QINN LKTEDTATYFCARGEIYYGYDGGFAYWGQGTLVTVSA	Варибельная тяжелая цепь (VH) антитела против BCMA
33	DVVM TQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDVNTAVSWYQQ KPGQSPKLLIFSASYRYTGVPDRFTGSGSGADFTLTISSVQAEDL AVYYCQQHYSTPWTFGGG TKLDIK	Варибельная легкая цепь (VL) антитела против BCMA
34	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGHIYPGDS DTRYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARYSGSFDNWGQGTLVTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) антитела против BCMA
35	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVNWWYQQL PGTAPKLLIYTNNQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEA DYYCAAWDGS LNGLVFGGGTKLTVLG	Варибельная легкая цепь (VL) антитела против BCMA
36	GGGS	Линкер
37	GGGS	Линкер
38	GGGSGGGSGGGGS	Линкер
39	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер
40	SRGGGSGGGSGGGGSLEMA	Линкер
41	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTD TAYMEL	Варибельная тяжелая цепь (VH) антитела

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
	SSLRSED TAVYYC ARSGYSK SIVSYMDYWGQGLTVTVSS	против BCMA
42	LPVLTQPPSTSGTPGQRTVSCSGSSSNIGSNVFWYQQL PGTAPKLVIIYRNNQRPSGVPDRFSVSKSGTSASLAISGLRSEDEA DYYCAAWDDSLSGYVFGTGTKVTVLG	Варибельная легкая цепь (VL) антитела против BCMA
43	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGRIIPILGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSED TAVYYC ARSGYGSYRWEDSWGQGLTVTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) антитела против BCMA
44	QAVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSNIGSNYFWYQQL PGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEAD YYCAAWDDSLSASYVFGTGTKVTVLG	Варибельная легкая цепь (VL) антитела против BCMA
45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWV RQAPGQRLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQDRITVTRDTSSNTGY MELTRLRSDD TAVYYC ARSPYSGVLDKWGQGLTVTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) антитела против BCMA
46	QSVLTQPPSVSGAPGQRTVISTGSSSNIGAGFDVHWYQQ LPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDA ADYYCQSYDSSLSGYVFGTGTKVTVLG	Варибельная легкая цепь (VL) антитела против BCMA
47	RASQDISKYL N	CDR L1
48	SRLHSGV	CDR L2
49	GNTLPYTFG	CDR L3
50	DYGVS	CDR H1
51	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
52	YAMDYWG	CDR H3
53	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNS LQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	VH
54	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N WYQQK DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPYTFGGGKLEIT	VL
55	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N WYQQK DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQ ESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYY	scFv

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
	CAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	
56	KASQNVGTNVA	CDR L1
57	SATYRNS	CDR L2
58	QQYNRYPYT	CDR L3
59	SYWMN	CDR H1
60	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
61	KTISSVDFYFDY	CDR H3
62	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVK QRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYM QLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSS	VH
63	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQ KPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDL ADYFCQQYNRYPYTSGGGGTKLEIKR	VL
64	GGGGSGGGSGGGGS	Линкер
65	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVK QRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYM QLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGG GSGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGT NVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLT ITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGGTKLEIKR	scFv
66	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
67	HTSRLHS	LC-CDR2
68	QQGNTLPYT	LC-CDR3
69	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgcagcctggcgaccgggtga ccatcagctgccgggcccagccaggacatcagcaagtacctaactggatcagcagaagcccagc gcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgcccagccggttagcg gcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaagatatgccacct acttttgccagcaggggaacacactgcctacacctttggcggcggaacaaagctggaaatcaccgg cagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcagcaccaagggcgaggtgaagct gcaggaaagcggccctggcctggtggccccagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagcg gcgtgagcctgcccgaactacggcgtgagctggatccggcagccccccaggaagggcctggaatgg ctgggcgtgatctggggcagcgagaccactactacaacagcgcctgaagagccggctgaccatc atcaaggacaacagcaagagccaggtgttctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgc	Последовательно сть, кодирующая scFv

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
	catctactactgcgccaagcactactactacggcggcagctacgccatggactactggggccagggc accagcgtgaccgtgagcagc	
70	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Fc IgG4 человека (Uniprot P01861)
71	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVE WESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc IgG2 человека (Uniprot P01859)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ оценки геномной интеграции последовательности трансгена, включающий:

(а) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, где указанные одна или несколько клеток содержит, или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок;

(b) по высокомолекулярной фракции, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена, интегрированного в геном одной или нескольких клеток.

2. Способ по п.1, где, до отделения в (а), выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из одной или нескольких клеток.

3. Способ по п.1 или п.2, где определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в (b) включает определение массы, веса или количества копий последовательности трансгена на диплоидный геном или на клетку в одной или нескольких клетках.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где одна или несколько клеток содержит популяцию клеток, в которой множество клеток из популяции содержат последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок.

5. Способ по п.3 или п.4, где количество копий представляет собой среднее или среднее арифметическое количество копий на диплоидный геном или на клетку среди популяции клеток.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где, до отделения в (а), полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, введен по меньшей мере в одну модифицированную клетку из одной или нескольких клеток.

7. Способ по п.6, где по меньшей мере одна модифицированная клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно 37°C±2°C, в течение более чем 96 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена.

8. Способ по п.6, где по меньшей мере одна модифицированная клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно 37°C±2°C, в течение более чем 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена.

9. Способ по п.6, где по меньшей мере одна модифицированная клетка не инкубирована при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно 37°C±2°C, в течение более чем 48 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где одна или несколько клеток криоконсервирована до отделения высокомолекулярной фракции ДНК в (а).

11. Способ по любому из пп. 1-10, где одна или несколько клеток представляет собой линию клеток.

12. Способ по любому из пп. 1-10, где одна или несколько клеток представляет собой первичную клетку, полученную из образца от субъекта.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где одна или несколько клеток представляет собой иммуноцит.

14. Способ по п.13, где иммуноцит представляет собой Т-клетку или клетку NK.

15. Способ по п.14, где Т-клетка представляет собой CD3+, CD4+ и/или CD8+ Т-клетку.

16. Способ оценки последовательности трансгена в биологическом образце от субъекта, включающий:

(а) отделение высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, присутствующих в биологическом образце от субъекта, где биологический образец содержит, или, как подозревают, содержит, по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок; и

(б) по высокомолекулярной фракции, определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена во всем или части биологического образца.

17. Способ по п.16, где определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в (б) включает определение массы, веса или количества копий последовательности трансгена во всем или части биологического образца.

18. Способ по п.16 или п.17, где, до отделения, выделяют ДНК из одной или нескольких клеток, присутствующих в биологическом образце.

19. Способ по любому из пп. 16-18, где биологический образец получен от субъекта, которому вводили композицию, содержащую по меньшей мере одну модифицированную клетку, содержащую последовательность трансгена.

20. Способ по любому из пп. 16-19, где биологический образец представляет собой образец ткани или образец физиологической жидкости.

21. Способ по п.20, где биологический образец представляет собой образец ткани, и ткань представляет собой опухоль.

22. Способ по п.20 или п.21, где образец ткани представляет собой биоптат опухоли.

23. Способ по п.20, где биологический образец представляет собой образец физиологической жидкости, и образец физиологической жидкости представляет собой образец крови или сыворотки.

24. Способ по любому из пп. 16-23, где, до отделения в (а), полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, введен по меньшей мере в одну модифицированную клетку из одной или нескольких клеток.

25. Способ по любому из пп. 16-24, где одна или несколько клеток в биологическом образце содержат иммуноцит.

26. Способ по п.25, где иммуноцит представляет собой Т-клетку или клетку NK.

27. Способ по п.26, где Т-клетка представляет собой CD3+, CD4+ и/или CD8+ Т-клетку.

28. Способ по любому из пп. 1-27, где отделение проводят посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле или эксклюзионной хроматографии.

29. Способ по любому из пп. 1-28, где отделение проводят посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле.

30. Способ оценки геномной интеграции последовательности трансгена, включающий:

(а) отделение, посредством электрофореза в геле в пульсирующем поле, высокомолекулярной фракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) более чем или более чем приблизительно 10 тысяч пар оснований (т.п.о.) из ДНК, выделенной из популяции клеток, где указанная популяция клеток содержит множество модифицированных клеток, каждая из которых содержит, или как подозревают, содержит, последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок; и

(б) по высокомолекулярной фракции, определение среднего или среднего арифметического количества копий на диплоидный геном или на клетку последовательности трансгена, интегрированного в геном множества модифицированных клеток из популяции клеток.

31. Способ по п.30, где, до отделения в (а), полинуклеотид, содержащий последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок, вводят по меньшей мере в одну из множества модифицированных клеток из популяции клеток.

32. Способ по п.31, где популяция клеток не инкубирована при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно 37°C±2°C, в течение более чем 96 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, по меньшей мере в одну модифицированную клетку.

33. Способ по п.31, где популяция клеток не инкубирована при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно 37°C±2°C, в течение более чем 72 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, по меньшей мере в одну модифицированную клетку.

34. Способ по п.31, где популяция клеток не инкубирована при температуре более чем 25°C, необязательно, точно или приблизительно 37°C±2°C, в течение более чем 48 часов после введения полинуклеотида, содержащего последовательность трансгена, по меньшей мере в одну модифицированную клетку.

35. Способ по любому из пп. 30-34, где популяция клеток криоконсервирована до отделения высокомолекулярной фракции ДНК в (а).

36. Способ по любому из пп. 1-35, где высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 15 тысяч пар оснований (т.п.о.).

37. Способ по любому из пп. 1-35, где высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 17,5 тысяч пар оснований (т.п.о.).

38. Способ по любому из пп. 1-35, где высокомолекулярная фракция составляет более чем или более чем приблизительно 20 тысяч пар оснований (т.п.о.).

39. Способ по любому из пп. 1-38, где последовательность трансгена содержит регуляторный элемент, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок.

40. Способ по любому из пп. 1-39, где определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена проводят посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР).

41. Способ по п.40, где ПЦР представляет собой количественную полимеразную цепную реакцию (qПЦР), цифровую ПЦР или капельную цифровую ПЦР.

42. Способ по п.40 или п.41, где ПЦР представляет собой капельную цифровую ПЦР.

43. Способ по любому из пп. 40-42, где ПЦР проводят с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части последовательности трансгена.

44. Способ по п.43, где один или несколько праймеров являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации последовательности регуляторного элемента.

45. Способ по любому из пп. 1-44, где определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена на массу или вес ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток, необязательно, на микрограмм ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток.

46. Способ по п.45, где определение количества последовательности трансгена включает оценку массы или веса последовательности трансгена в микрограммах, на микрограмм ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток.

47. Способ по любому из пп. 1-44, где определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена на одну или несколько клеток, необязательно, на CD3+, CD4+ и/или CD8+ клетку, и/или на клетку, экспрессирующую рекомбинантный белок.

48. Способ по любому из пп. 16-44, где определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена на диплоидный геном или на клетку в биологическом образце.

49. Способ по п.48, где количество копий представляет собой среднее или среднее арифметическое количество копий на диплоидный геном или на клетку среди одной или нескольких клеток в биологическом образце.

50. Способ по любому из пп. 16-44, где определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена на объем биологического образца, необязательно, на микролитр или на миллилитр биологического образца.

51. Способ по любому из пп. 16-44, где определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена на массу тела или площадь поверхности тела субъекта.

52. Способ по любому из пп. 1-48, где определение количества последовательности трансгена включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции и нормализацию массы, веса или количества копий по массе, весу или количеству копий эталонного гена в высокомолекулярной фракции, или по стандартной кривой.

53. Способ по п.52, где эталонный ген представляет собой ген домашнего хозяйства.

54. Способ по п.52 или п.53, где эталонный ген представляет собой ген, кодирующий альбумин (ALB).

55. Способ по п.52 или п.53, где эталонный ген представляет собой ген, кодирующий субъединицу р30 белка рибонуклеазы Р (RPP30).

56. Способ по п.52-55, где количество копий эталонного гена в выделенной ДНК определяют посредством ПЦР с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части эталонного гена.

57. Способ по любому из пп. 1-6, где последовательность трансгена не кодирует полный вирусный белок gag.

58. Способ по любому из пп. 1-57, где последовательность трансгена не содержит полный геном HIV, компетентный по репликации вирусный геном, и/или вспомогательные гены, где вспомогательные гены, необязательно, представляют собой Nef, Vpr, Vif, Vpr и/или Vpx.

59. Способ по любому из пп. 6-15, 24-29 и 31-57, где введение полинуклеотида проводят посредством трансдукции вирусным вектором, содержащим полинуклеотид.

60. Способ по п.59, где вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор.

61. Способ по п.59 или п.60, где вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

62. Способ по п.59, где вирусный вектор представляет собой вектор AAV, необязательно, выбранный из числа векторов AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 или AAV8.

63. Способ по любому из пп. 6-15, 24-29 и 31-57, где введение полинуклеотида проводят посредством способа физической доставки, необязательно посредством электропорации.

64. Способ по любому из пп. 1-63, где рекомбинантный белок представляет собой рекомбинантный рецептор.

65. Способ по п.64, где рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием, или антигеном, экспрессированным в клетках из окружения очага, ассоциированного с заболеванием или состоянием.

66. Способ по п.65, где заболевание или состояние представляет собой злокачественную опухоль.

67. Способ по п.65 или п.66, где антиген выбран из интегрина $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ (интегрин avb6), антигена созреваия В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, лиганда 1 хемокинов с мотивом C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора эпидермального фактора роста с мутацией типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHA2), рецептора эстрогена, подобного рецептору Fc белка 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), связывающего фолат белка (FBP), рецептора-альфа фолата, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G-белком рецептора, класса C, группы 5, члена D (GPC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, ассоциированного с меланомой высокомолекулярного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена вируса гепатита В, человеческого лейкоцитарного антигена A1 (HLA-A1), человеческого лейкоцитарного антигена A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R α), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R α 2), рецептора, содержащего домен вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 из L1-CAM, члена A семейства 8, содержащего богатые лейцином повторы (LRRC8A), Lewis Y, ассоциированного с меланомой антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, мышиноного цитомегаловируса (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов члена D группы 2 естественных киллеров (NKG2D), мелана A (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простатспецифического антигена, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простатспецифического мембранного антигена (PSMA),

подобного рецепторной тирозинкиназе орфанного рецептора 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобластов (TPBG также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром-таутомераза, допахром-дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), специфического для патогена или экспрессируемого патогеном антигена, или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул, и/или молекул, экспрессированных HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

68. Способ по любому из пп. 64-67, где рекомбинантный рецептор представляет собой рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор.

69. Способ по любому из пп. 64-68, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

70. Способ по п.69, где CAR содержит внеклеточный узнающий антиген домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий ITAM.

71. Способ по п.70, где внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий ITAM, содержит внутриклеточный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ), необязательно, цепи CD3-дзета человека.

72. Способ по п.70 или п.71, где внутриклеточный передающий сигналы домен дополнительно содержит передающую костимулирующие сигналы область.

73. Способ по п.72, где передающая костимулирующие сигналы область содержит передающий сигналы домен из CD28 или 4-1BB, необязательно CD28 человека или 4-1BB человека.

74. Способ оценки остаточной неинтегрированной последовательности трансгена, включающий:

(1) осуществление способа по любому из пп. 1-15 и 28-73, для определения присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в высокомолекулярной фракции ДНК, таким образом, оценку геномной интеграции последовательности трансгена;

(2) определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции;

(3) сравнение количества, определенного в (1), с количеством, определенным в (2), таким образом, определение количества остаточной неинтегрированной рекомбинантной последовательности.

75. Способ по п.74, где определение присутствия, отсутствия или количества последовательности трансгена включает определение массы, веса или количества копий

последовательности трансгена на диплоидный геном или на клетку в одной или нескольких клетках.

76. Способ по п.74 или п.75, где одна или несколько клеток содержит популяцию клеток, в которой множество клеток из популяции содержат, или, как подозревают, содержат, последовательность трансгена, кодирующего рекомбинантный белок.

77. Способ по п.75 или п.76, где количество копий представляет собой среднее или среднее арифметическое количество копий на диплоидный геном или на клетку среди популяции клеток.

78. Способ по любому из пп. 75-77, где сравнение количества включает вычитание количества копий, определенного в (1), из количества копий, определенного в (2).

79. Способ по любому из пп. 75-77, где сравнение количества включает определение соотношения количества копий, определенного в (1), к количеству копий, определенному в (2).

80. Способ по любому из пп. 74-79, где определение присутствия, отсутствия или количества в (2) проводят посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР).

81. Способ по п.80, где ПЦР представляет собой количественную полимеразную цепную реакцию (qПЦР), цифровую ПЦР или капельную цифровую ПЦР.

82. Способ по п.80 или п.81, где ПЦР представляет собой капельную цифровую ПЦР.

83. Способ по любому из пп. 80-82, где ПЦР проводят с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части последовательности трансгена.

84. Способ по любому из пп. 74-83, где определение присутствия, отсутствия или количества в (2) включает оценку массы, веса или количества копий последовательности трансгена в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции и нормализацию массы, веса или количества копий по массе, весу или количеству копий эталонного гена в выделенной ДНК без отделения высокомолекулярной фракции, или по стандартной кривой

85. Способ по п.84, где эталонный ген представляет собой ген домашнего хозяйства.

86. Способ по п.84 или п.85, где эталонный ген представляет собой ген, кодирующий альбумин (ALB).

87. Способ по п.84 или п.85, где эталонный ген представляет собой ген, кодирующий субъединицу р30 белка рибонуклеазы Р (RPP30).

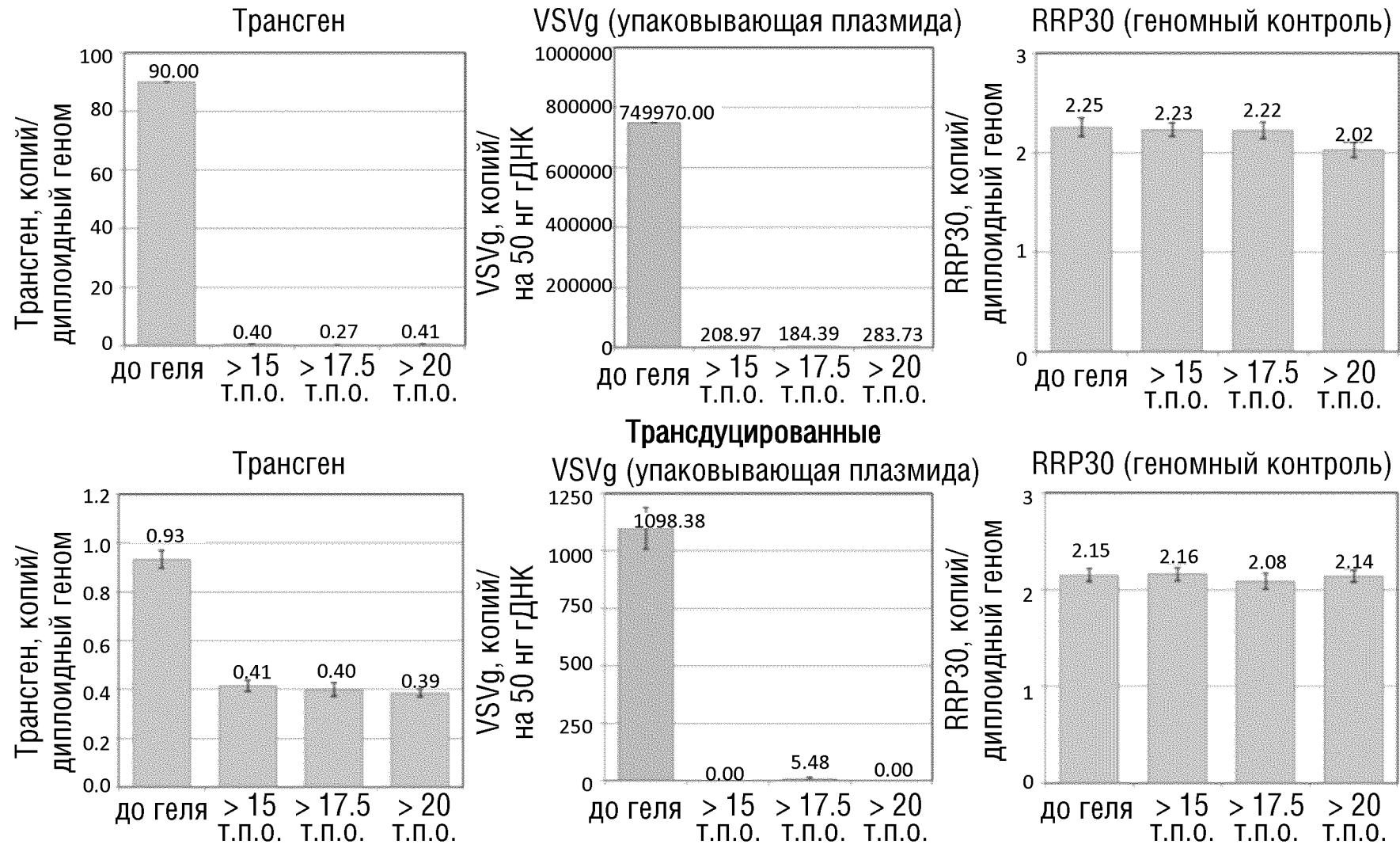
88. Способ по п.84-87, где определение массы, веса или количества копий эталонного гена в выделенной ДНК проводят посредством ПЦР с использованием одного или нескольких праймеров, которые являются комплементарными или являются способными к специфической амплификации по меньшей мере части эталонного гена.

89. Способ по любому из пп. 74-88, где определение присутствия, отсутствия или количества в (1) и определение присутствия, отсутствия или количества в (2) проводят посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием одинакового праймера или одинакового набора праймеров.

90. Способ по любому из пп. 74-89, где остаточная неинтегрированная рекомбинантная последовательность содержит одно или несколько из векторных плазмид, линейной комплементарной ДНК (кДНК), аутоинтегрантов или колец длинного концевого повтора (LTR).

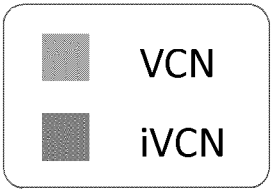
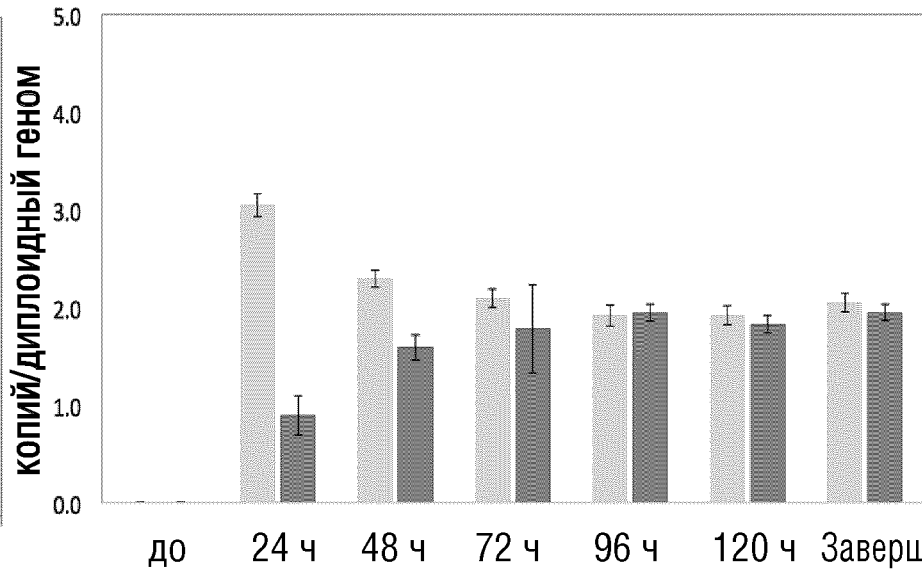
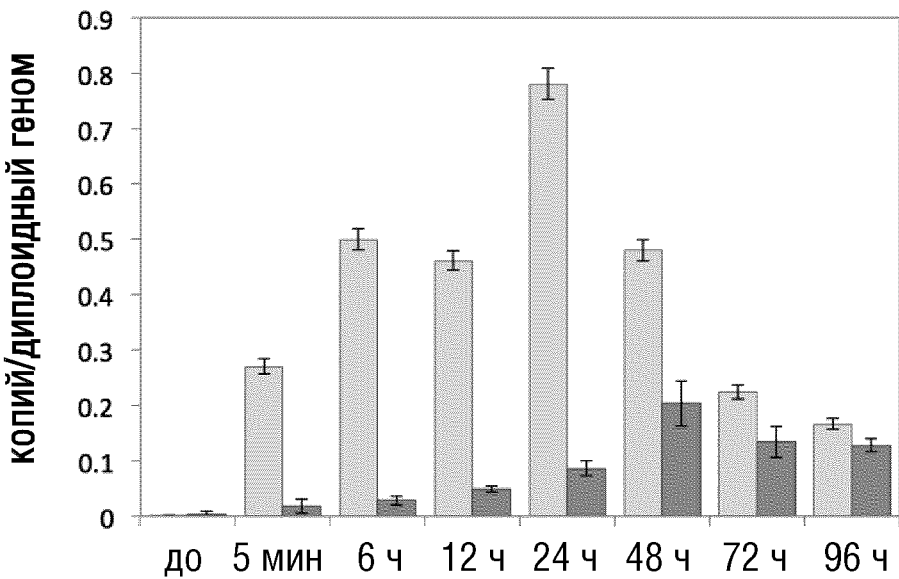
ФИГ.1

Нетрансдуцированный контроль, с добавлением плазмиды CAR и плазмиды VSVg

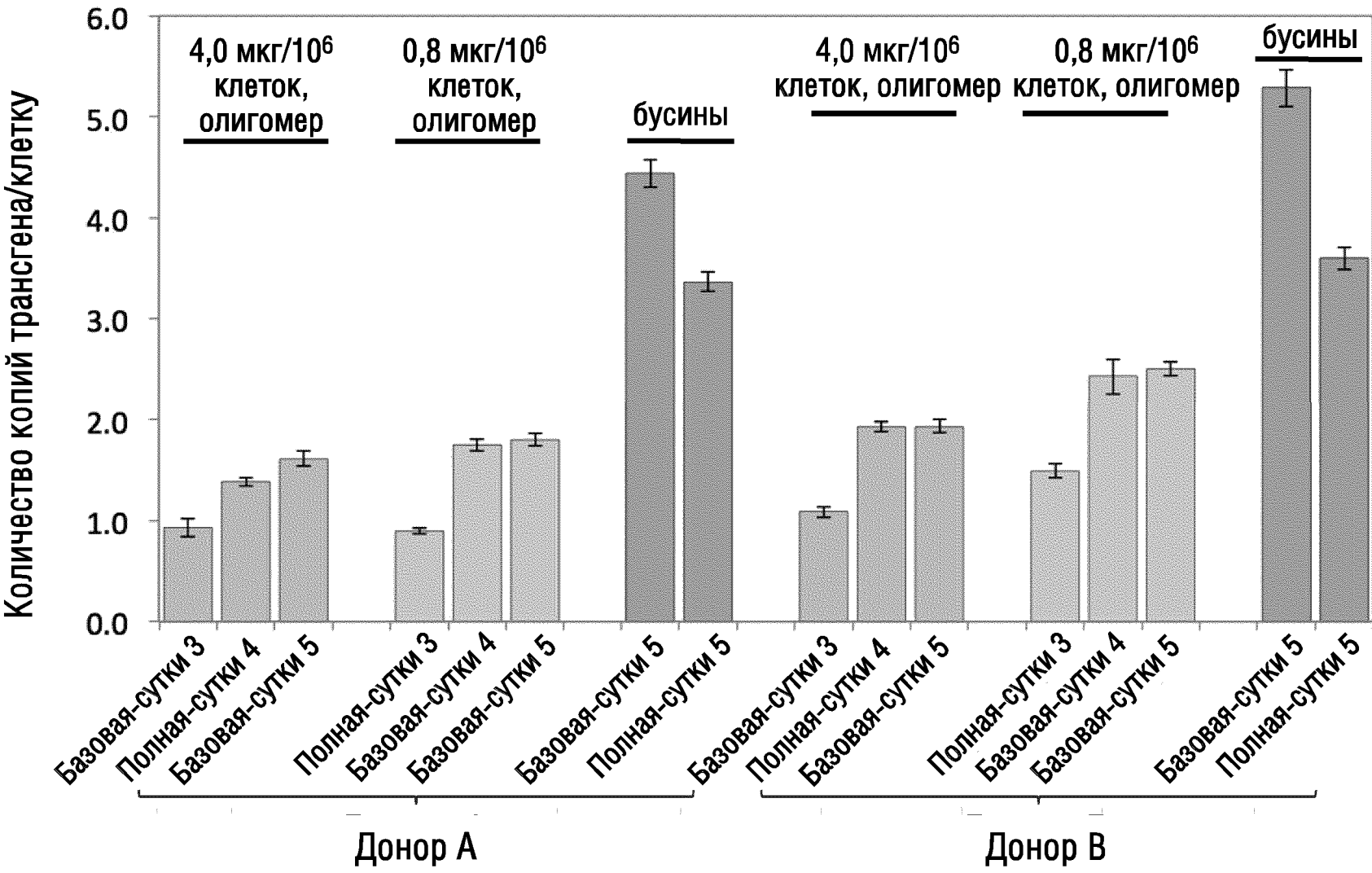


ФИГ.2А

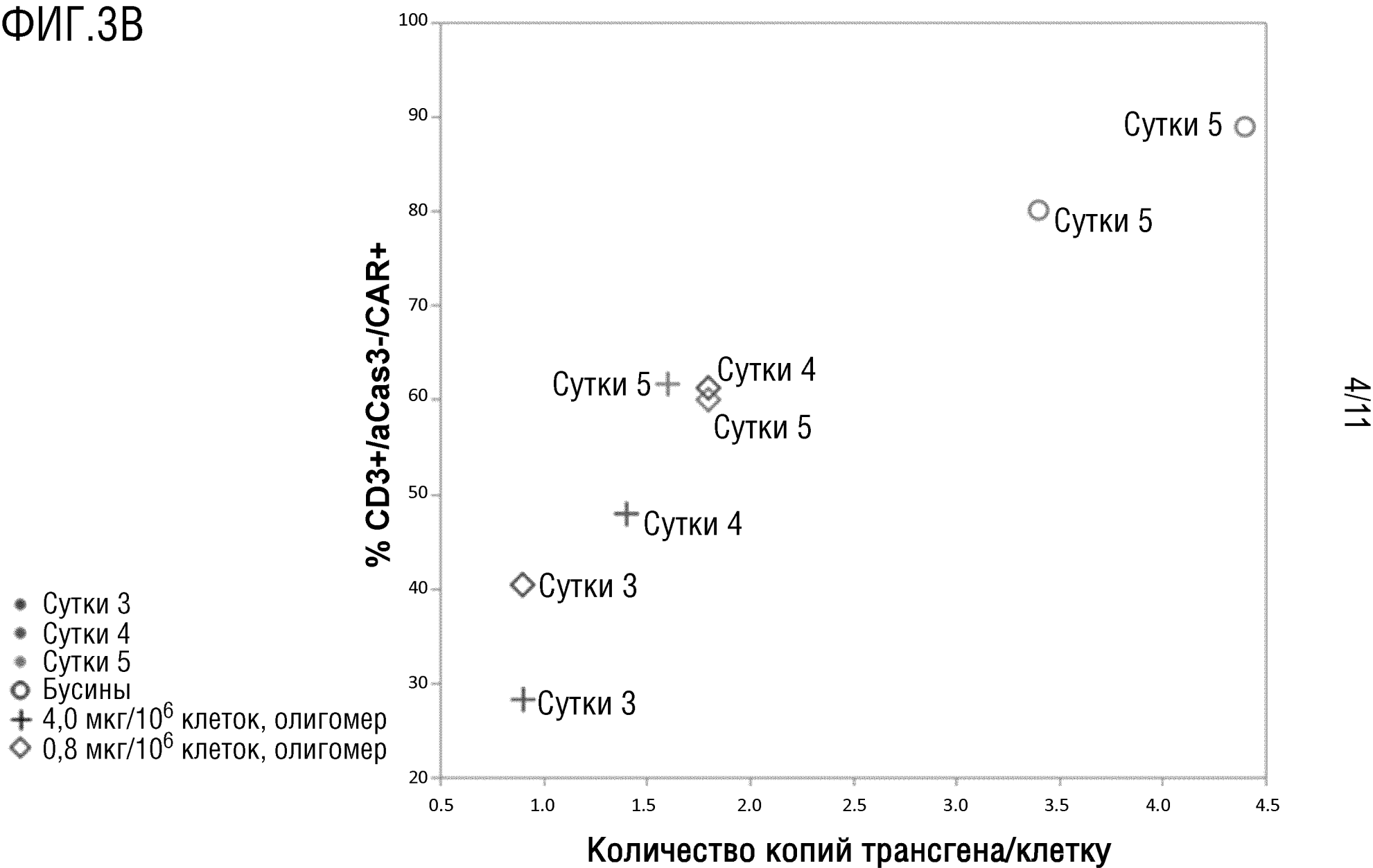
ФИГ.2В



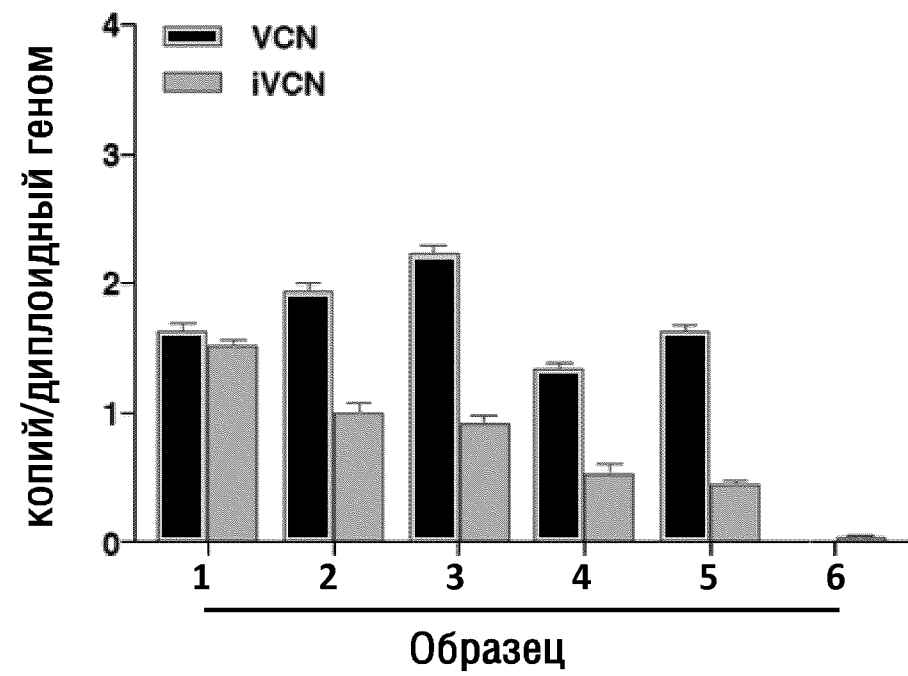
ФИГ.3А



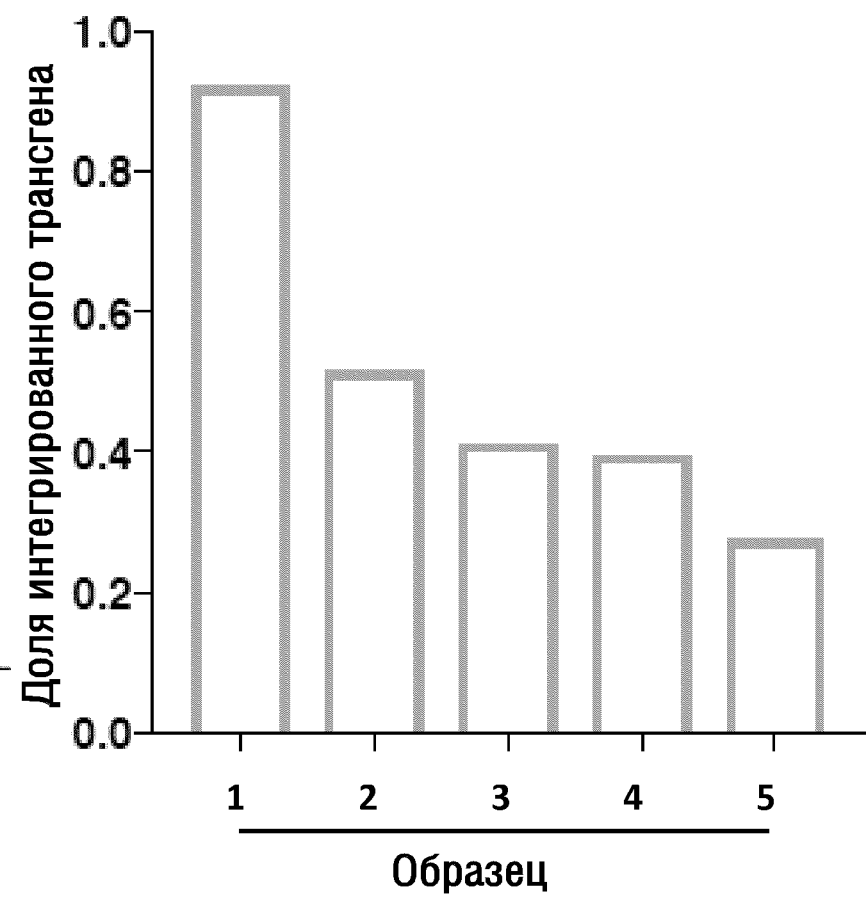
ФИГ.3В



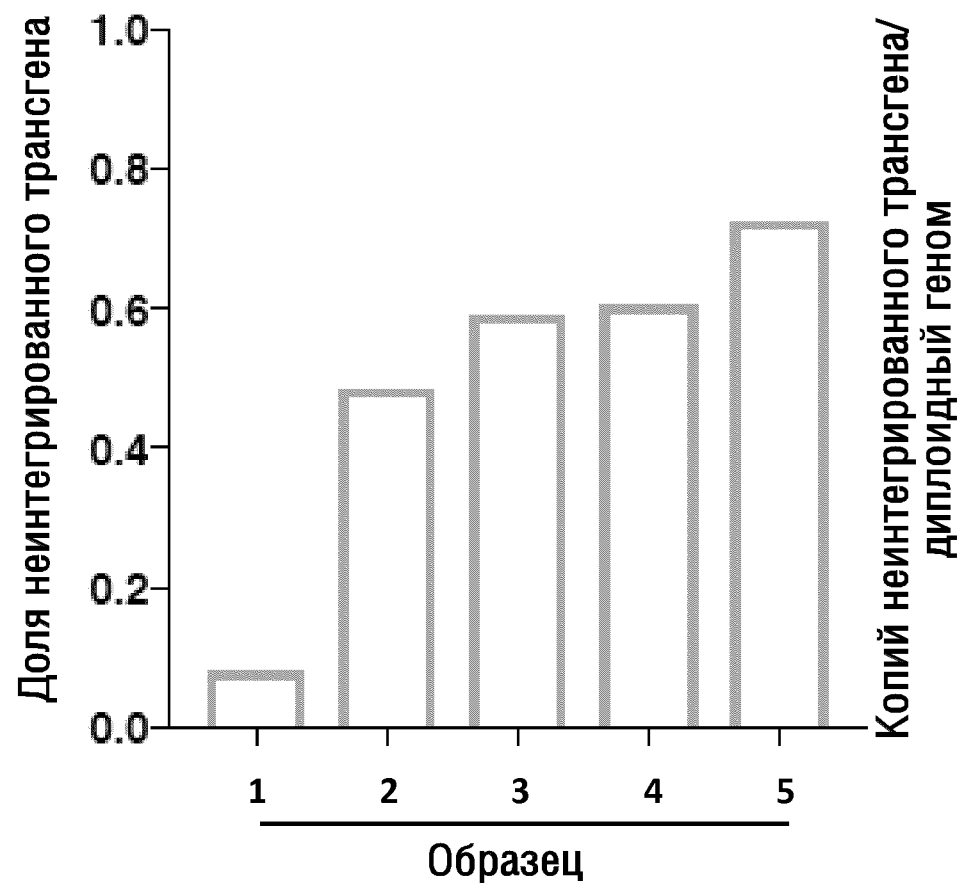
ФИГ.4А



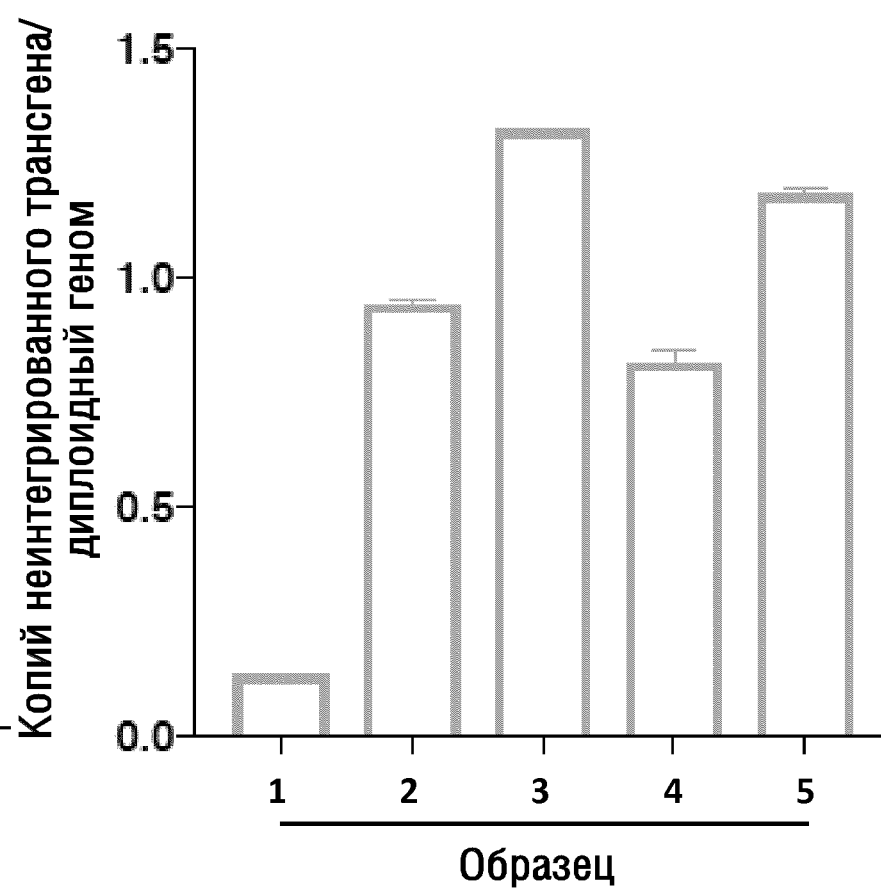
ФИГ.4В



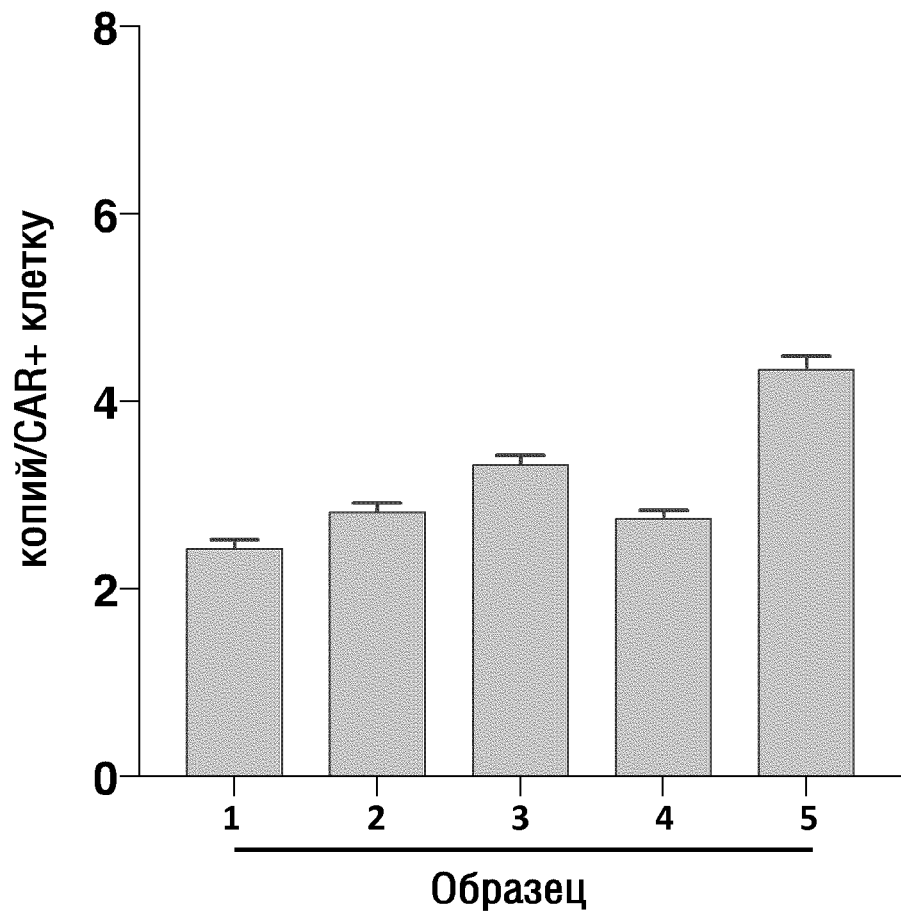
ФИГ.4С



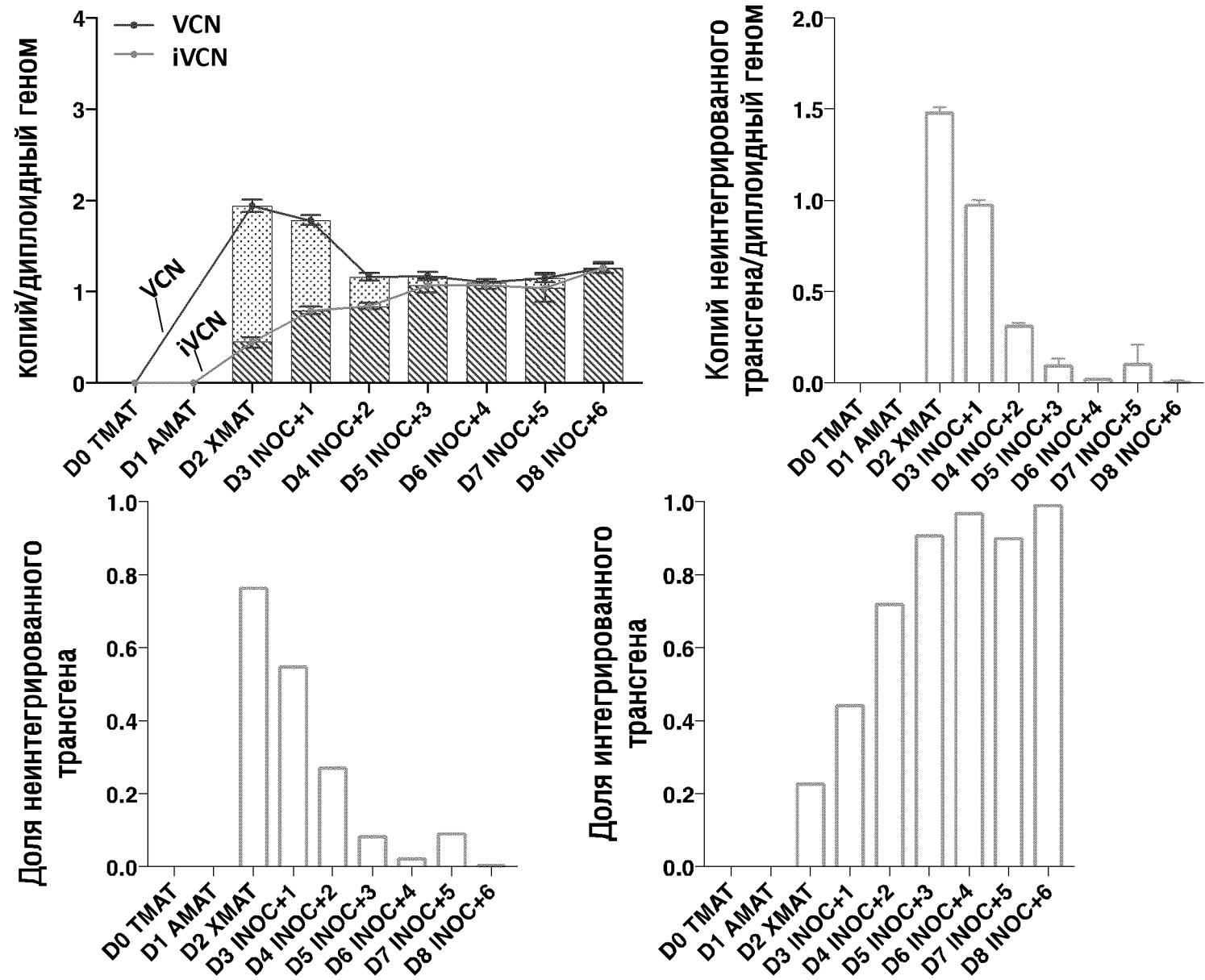
ФИГ.4D



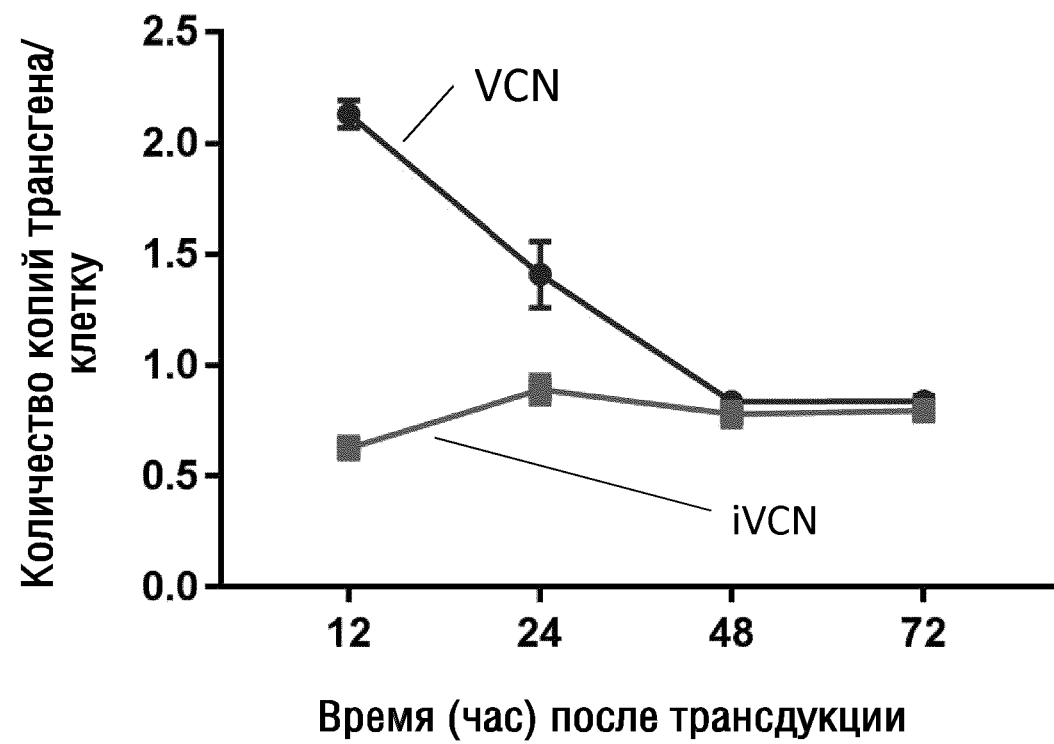
ФИГ.4Е



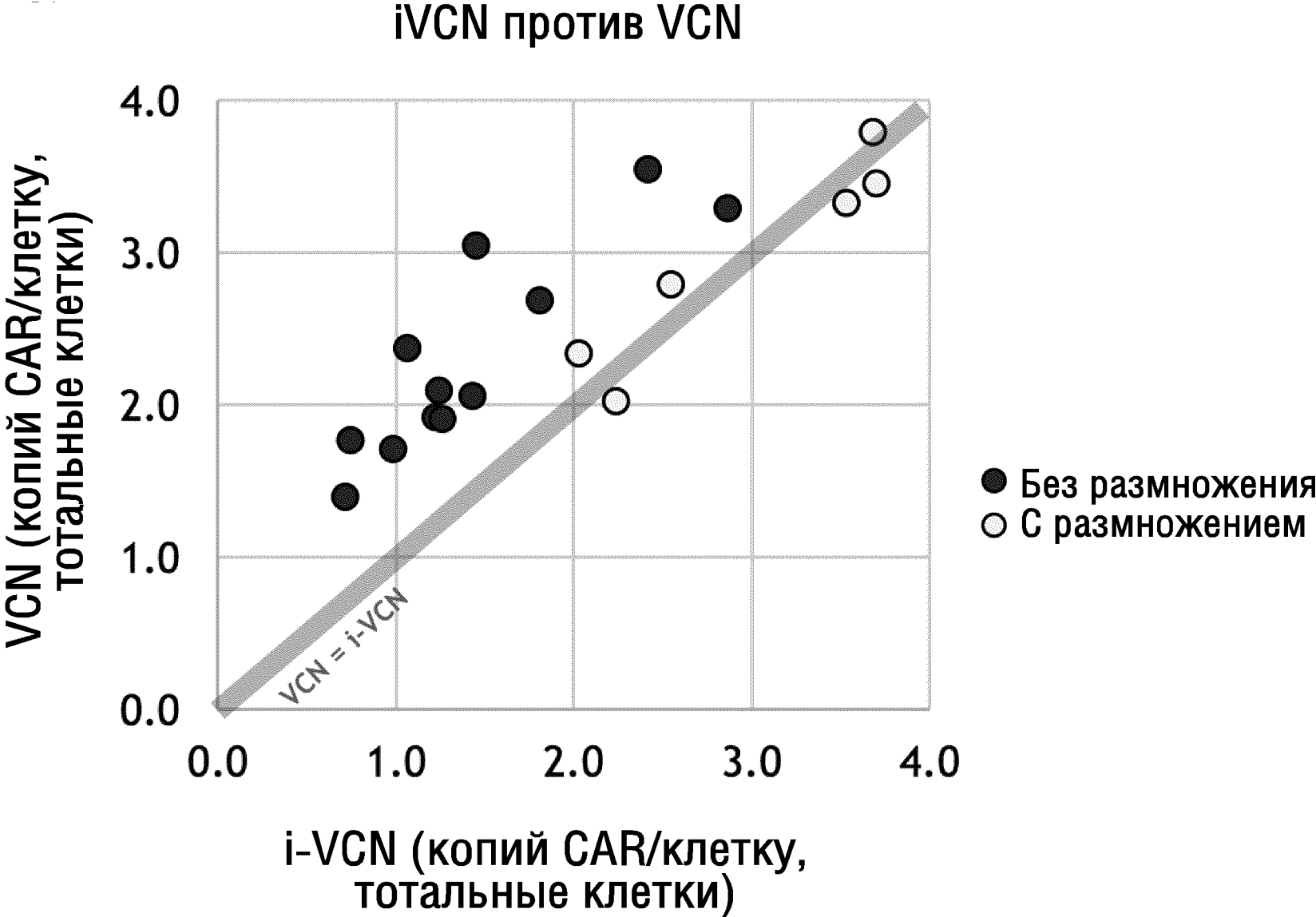
ФИГ.5



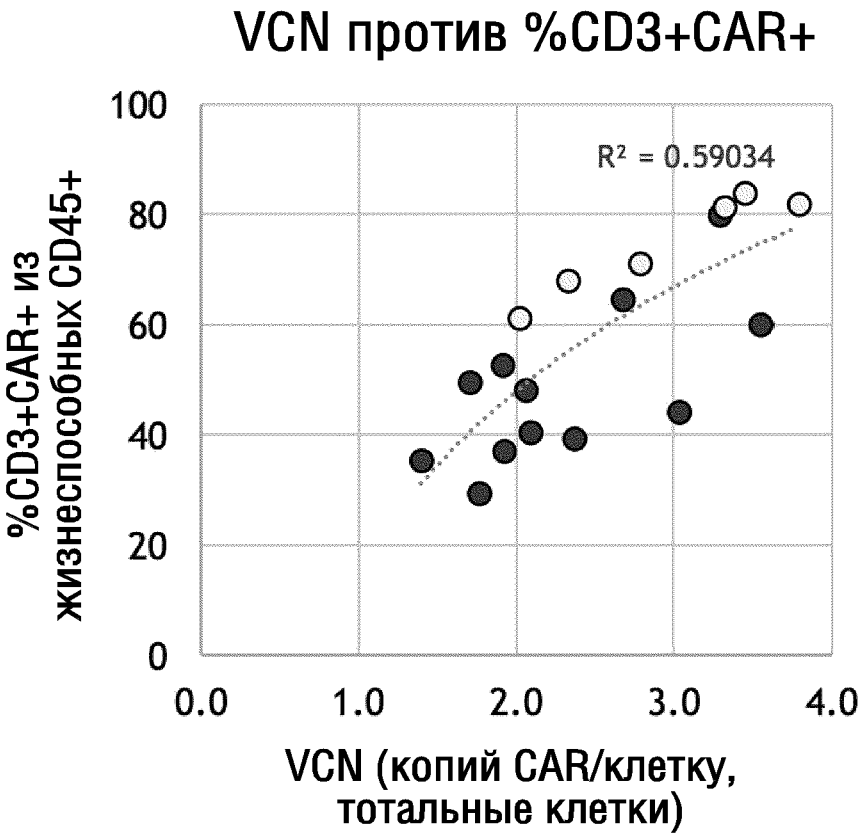
ФИГ.6



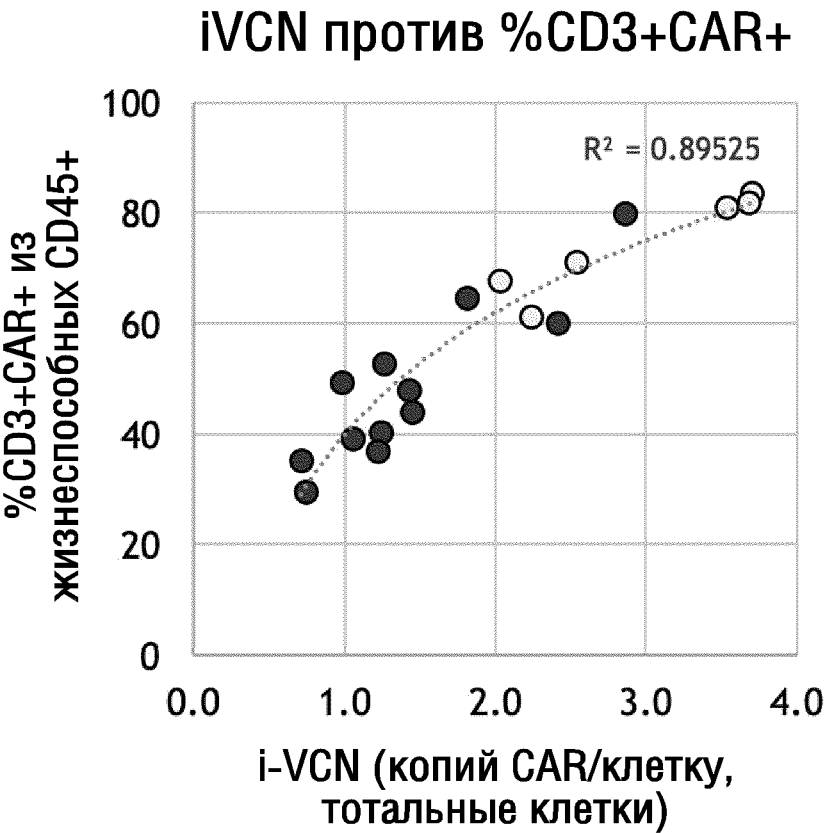
ФИГ.7А



ФИГ.7В



ФИГ.7С



● Без размножения
○ С размножением