

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202190693 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.07.27(51) Int. Cl. G01N 33/569 (2006.01)  
G01N 33/68 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2019.09.11(54) СПОСОБЫ АНАЛИЗА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ КОМПОЗИЦИЙ  
МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК

(31) 62/729,985

(72) Изобретатель:

(32) 2018.09.11

Прентис Кеннет Майо (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2019/050681

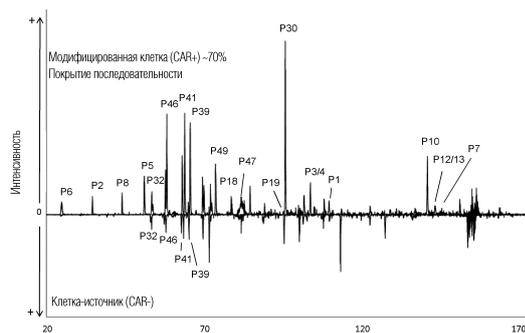
Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2020/056047 2020.03.19

(71) Заявитель:

ДЖУНО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(57) Настоящее изобретение относится к способам получения профиля масс-спектрометрии (MS) образца из композиции клеток, такой как композиция модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления профиль масс-спектрометрии включает данные, основанные на одном или более анализах или способах масс-спектрометрии. Настоящее изобретение относится также к способам на основании профилей масс-спектрометрии одного или более образцов таких композиций клеток: идентификации профиля масс-спектрометрии (MS) композиции генетически модифицированных клеток, содержащий иммунциты, содержащие рекомбинантный рецептор, посредством сравнения с эталонным профилем масс-спектрометрии; характеристики способа получения композиции генетически модифицированных клеток; оценки белков поверхности клеток из композиции модифицированных клеток и оценки способа получения композиции генетически модифицированных клеток.



A1

202190693

202190693

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567478EA/032

### СПОСОБЫ АНАЛИЗА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ КОМПОЗИЦИЙ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК

#### Перекрестная ссылка на родственные заявки

**[0001]** По настоящей заявке испрашивается приоритет Предварительной заявки США No. 62/729985, поданной 11 сентября 2018 г., озаглавленной «Methods for Mass Spectrometry Analysis of Engineered Cell Compositions», 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 735042019040SeqList.txt, созданного 11 сентября 2019 г., имеющего размер 43886 байт. Полная информация в электронном формате из списка последовательностей приведена в качестве ссылки.

#### Область изобретения

**[0003]** Настоящее изобретение относится к способам получения профиля масс-спектрометрии (MS) образца из композиции клеток, такой как композиция модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии включает данные, основанные на одном или более анализах или способах масс-спектрометрии. Настоящее изобретение относится также к способам, на основании профилей масс-спектрометрии одного или более образцов таких композиций клеток: идентификации профиля масс-спектрометрии (MS) композиции генетически модифицированных клеток, содержащей иммуноциты, содержащие рекомбинантный рецептор, посредством сравнения с эталонным профилем масс-спектрометрии; характеристики способа получения композиции генетически модифицированных клеток; оценки белков поверхности клеток из композиции модифицированных клеток; и оценки способа получения композиции генетически модифицированных клеток.

#### Уровень техники

**[0004]** Показано, что виды аутологичной Т-клеточной терапии, такие как виды Т-клеточной терапии с использованием химерных рецепторов антигенов (CAR), являются многообещающими для лечения субъектов с заболеваниями, включая злокачественные опухоли, такие как рецидивирующие и невосприимчивые В-клеточные злокачественные новообразования, такие как острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз и неходжскинские лимфомы. В то время как такие виды терапии имеют большой потенциал для обеспечения преимущества для пораженных заболеванием субъектов, виды аутологичной Т-клеточной терапии, как правило, являются более сложными, чем альтернативные виды терапии, частично из-за того факта, что лекарственный препарат включает живые клетки, полученные от субъектов, имеющих различный генетический фон и различные варианты или степени заболевания, и что клетки необходимо

перерабатывать или генетически модифицировать для получения конечного лекарственного препарата. Принимая во внимание такую сложность, следует следить за обеспечением того, чтобы получать препараты для клеточной терапии с постоянным качеством среди различных субъектов. В данной области существует необходимость в дополнительных способах анализа композиций клеток и реагентов, используемых для получения препаратов для клеточной терапии.

#### Сущность изобретения

**[0005]** Настоящее изобретение относится к способам идентификации профиля масс-спектрометрии (MS) композиции генетически модифицированных клеток, включающим: определение тестируемого профиля масс-спектрометрии образца из тестируемой композиции модифицированных клеток или ее подгруппы с использованием способа масс-спектрометрии, где указанная тестируемая композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты, содержащие рекомбинантный рецептор; сравнение тестируемого профиля масс-спектрометрии с эталонным профилем масс-спектрометрии; и идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в тестируемом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с эталонным профилем масс-спектрометрии, таким образом, идентификацию профиля масс-спектрометрии композиции клеток, содержащей рекомбинантный рецептор.

**[0006]** Настоящее изобретение относится также к способам идентификации профиля масс-спектрометрии (MS) композиции генетически модифицированных клеток, включающим: определение тестируемого профиля масс-спектрометрии образца из тестируемой композиции модифицированных клеток или ее подгруппы с использованием способа масс-спектрометрии, где указанная тестируемая композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор; сравнение тестируемого профиля масс-спектрометрии с эталонным профилем масс-спектрометрии; и идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в тестируемом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с эталонным профилем масс-спектрометрии, таким образом, идентификацию профиля масс-спектрометрии, уникального для образца.

**[0007]** Настоящее изобретение относится также к способам идентификации профиля масс-спектрометрии (MS) композиции генетически модифицированных клеток, включающим: определение тестируемого профиля масс-спектрометрии образца из тестируемой композиции модифицированных клеток или ее подгруппы с использованием способа масс-спектрометрии, где указанная тестируемая композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты, содержащие рекомбинантный рецептор; и идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в тестируемом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с эталонным профилем масс-спектрометрии, таким образом, идентификацию профиля масс-

спектрометрии композиции клеток, содержащей рекомбинантный рецептор, уникального для образца.

**[0008]** В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции или представляет собой средний профиль масс-спектров ряда образцов из множества эталонных композиций.

**[0009]** В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии основан на образце из эталонной композиции. В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии основан на множестве образцов из эталонной композиции. В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии основан на ряде образцов из множества эталонных композиций.

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления, тестируемая композиция модифицированных клеток предназначена для использования в аутологичной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, тестируемую композицию модифицированных клеток получают способом, включающим: отбор или выделение иммуноцитов из образца от субъекта, таким образом, получение композиции-источника, необязательно, где биологический образец представляет собой образец после лейкофереза, образец после афереза или образец цельной крови; инкубацию клеток из композиции-источника с стимулирующим реагентом, таким образом, получение стимулированной композиции, где инкубацию, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов; введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, в иммуноциты из стимулированной композиции, таким образом, получение трансформированной композиции; и культивирование стимулированной композиции при 37° С в течение по меньшей мере 24 часов, таким образом, получение тестируемой композиции модифицированных клеток, где культивирование, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов.

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления, в эталонную композицию или каждую из множества эталонных композиций клеток не вводят молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции, и эталонная композиция клеток представляет собой композицию-источник клеток, содержащую иммуноциты, из которых тестируемая композиция клеток произошла или получена. В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции, где: тестируемая композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты, полученные от субъекта, где указанные иммуноциты содержат молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор; и эталонная композиция клеток представляет собой входную композицию, содержащую иммуноциты, полученные от субъекта, не содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный рецептор.

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции, и эталонная композиция клеток представляет собой композицию, полученную после, до или во время стадии производственного процесса для получения тестируемой композиции модифицированных клеток.

**[0014]** В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции, где тестируемая композиция модифицированных клеток получена на одной стадии способа, и эталонная композиция получена после, до или во время стадии, на которой получена тестируемая композиция модифицированных клеток.

**[0015]** В некоторых вариантах осуществления, тестируемая композиция модифицированных клеток представляет собой образец, полученный от субъекта, которому ранее вводили композицию модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, образец, полученный от субъекта, содержит иммунциты, модифицированные с использованием рекомбинантного рецептора, необязательно, как детектировано посредством проточной цитометрии или полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых вариантах осуществления, образец, полученный от субъекта, представляет собой образец крови или образец опухоли.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления, образец, полученный от субъекта, получен между или между приблизительно 6 и 30 суток, между или между приблизительно 14 и 29 суток, или между или между приблизительно 17 и 22 суток после введения модифицированных клеток субъекту. В некоторых вариантах осуществления, образец получен от субъекта на время или приблизительно на время того, или непосредственно после того, как пик клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, становится детектируемым в крови субъекта.

**[0017]** В некоторых вариантах осуществления, тестируемая композиция модифицированных клеток содержит клетки, приведенные в контакт со средством для получения зависимой от рекомбинантного рецептора активности, необязательно, где средство представляет собой антиген-мишень, способный к связыванию рекомбинантным рецептором, или представляет собой антиидиотипическое антитело, специфическое для антитела.

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии представляет собой средний профиль масс-спектров ряда образцов из множества эталонных композиций. В некоторых вариантах осуществления, каждая из множества эталонных композиций содержит клетки, содержащие рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, каждая из множества эталонных композиций получена таким же способом или по существу таким же способом, как композиция модифицированных клеток.

**[0019]** Настоящее изобретение относится к способам оценки способа получения композиции генетически модифицированных клеток, включающим расчет величины

изменчивости в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных среди ряда профилей масс-спектрометрии, на основании образцов из множества эталонных композиций модифицированных клеток или его подгруппы, где каждая из множества эталонных композиций модифицированных клеток содержит рекомбинантный рецептор, полученный таким же способом или по существу таким же способом.

**[0020]** Настоящее изобретение относится к способам оценки способа получения композиции генетически модифицированных клеток, включающим: получение среднего профиля масс-спектрометрии образца из множества эталонных композиций модифицированных клеток или его подгруппы, где каждая из множества эталонных композиций содержит рекомбинантный рецептор, полученный таким же способом или по существу таким же способом; и определение присутствия, отсутствия или уровня изменчивости или дисперсии среднего профиля масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает выбор способа получения композиции модифицированных клеток, если изменчивость или дисперсия профиля масс-спектрометрии среди множества эталонных композиций составляет не более чем 40%, не более чем 30%, не более чем 20%, не более чем 10% или не более чем 5%, или изменяется от такого среднего не более чем на одно стандартное отклонение среди компонентов данных.

**[0021]** Настоящее изобретение относится к способам оценки способа получения композиции генетически модифицированных клеток, включающим: получение среднего профиля масс-спектрометрии из ряда профилей масс-спектрометрии на основании образцов из множества эталонных композиций модифицированных клеток или его подгруппы, где каждая из множества эталонных композиций модифицированных клеток содержит рекомбинантный рецептор, полученный таким же способом или по существу таким же способом; и получение эталонного профиля масс-спектрометрии на основании ряда профилей масс-спектрометрии; и определение величины изменчивости в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных среди ряда дисперсий среднего профилей масс-спектрометрии, таким образом, определение степени дисперсии композиций клеток, полученных этим способом.

**[0022]** В некоторых вариантах осуществления, способы тестируют, с использованием профилей масс-спектрометрии, приводит ли способ получения композиций генетически модифицированных клеток к изменчивости или дисперсии среди множества композиций модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, степень такой изменчивости или дисперсии оценивают с использованием среднего профиля масс-спектрометрии на основании образцов из множества композиций модифицированных клеток.

**[0023]** В некоторых вариантах осуществления, способ включает выбор способа получения композиции генетически модифицированных клеток, если величина изменчивости в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных среди ряда профилей масс-спектрометрии составляет не более чем 40%, не более

чем 30%, не более чем 20%, не более чем 10% или не более чем 5% от уровня по меньшей мере одного компонента данных в эталонном профиле масс-спектрометрии.

**[0024]** В некоторых вариантах осуществления, средний профиль масс-спектрометрии получен для образца (1) клеток в эталонной композиции; (2) CD3+ клеток в композиции; (3) CD4+ Т-клеток в композиции; (4) CD8+ Т-клеток в композиции; (5) рекомбинантный рецептор+ клеток в композиции; (6) рекомбинантный рецептор+ CD3+ клеток в композиции; (7) рекомбинантный рецептор+ CD8+ клеток в композиции; или (8) рекомбинантный рецептор+ CD4+ клеток в композиции.

**[0025]** В некоторых вариантах осуществления, каждая из множества эталонных композиций получена способом, включающим: отбор или выделение иммуноцитов из образца от субъекта, таким образом, получение композиции-источника, необязательно, где биологический образец представляет собой образец после лейкофереза, образец после афереза или образец цельной крови; инкубацию клеток из композиции-источника с стимулирующим реагентом, таким образом, получение стимулированной композиции, где инкубацию, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов; введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, в иммуноциты из стимулированной композиции, таким образом, получение трансформированной композиции; и культивирование стимулированной композиции при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов, таким образом, получение тестируемой композиции модифицированных клеток, где культивирование, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов.

**[0026]** В некоторых вариантах осуществления, тестируемый профиль масс-спектрометрии и эталонный профиль масс-спектрометрии индивидуально представляет собой пептидный профиль. В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии определяют с использованием такого же способа масс-спектрометрии, как тестируемый профиль масс-спектрометрии.

**[0027]** Настоящее изобретение относится к способам характеристики способа получения композиции генетически модифицированных клеток, включающим: определение первого профиля масс-спектрометрии образца из первой композиции клеток с использованием способа масс-спектрометрии; определение второго профиля масс-спектрометрии образца из второй композиции клеток с использованием способа масс-спектрометрии; и идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в первом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с вторым профилем масс-спектрометрии, где первая композиция клеток и вторая композиция клеток содержат композиции на различных стадиях производственного процесса для получения композиции генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая композиции клеток находятся на различных стадиях получения композиции генетически модифицированных клеток и выбраны из: композиции-источника, содержащей иммуноциты, отобранные или выделенные из биологического образца от субъекта,

необязательно, где биологический образец представляет собой образец после лейкофереза, образец после афереза или образец цельной крови; стимулированной композиции, содержащей иммуноциты из выбранной композиции, приведенные в контакт с стимулирующим реагентом, необязательно, где приведение в контакт проводили в присутствии одного или более цитокинов; трансформированной композиции, содержащей клетки из стимулированной композиции, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный рецептор; и культивированной композиции, содержащей клетки из трансформированной композиции, культивированные при или приблизительно при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов, необязательно, где культивирование проводят в присутствии одного или более цитокинов.

**[0028]** В некоторых вариантах осуществления, первая композиция клеток представляет собой композицию с предшествующей стадии или предшествующей временной точки производственного процесса, по сравнению с второй композицией клеток.

**[0029]** Настоящее изобретение относится к способам характеристики способа получения композиции генетически модифицированных клеток, включающим: определение первого профиля масс-спектрометрии образца из первой композиции клеток с использованием способа масс-спектрометрии; определение второго профиля масс-спектрометрии образца из второй композиции клеток с использованием способа масс-спектрометрии; и идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в первом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с вторым профилем масс-спектрометрии, где первая композиция клеток и вторая композиция клеток содержат генетически модифицированные клетки, полученные различными способами. В некоторых вариантах осуществления, различные способы отличаются одним или более из присутствия или концентрации сыворотки; времени в культуре; партии реагента; манипуляций с реагентом или его хранения; присутствия или количества стимулирующего реагента; типа стимулирующего реагента; присутствия или количества одного или более цитокинов; присутствия или количества аминокислот; температуры; источника или типа иммуноцитов композиции-источника; соотношения или процента типов иммуноцитов в композиции-источнике, необязательно, соотношения CD4+/CD8+ клеток; плотности клеток; статической культуры; вращающейся культуры; перфузии; типа вирусного вектора; количества копий вектора; присутствия адъюванта для трансдукции; плотности клеток из композиции-источника при криоконсервировании; степени экспрессии рекомбинантного рецептора; или присутствия соединения для модуляции фенотипа клетки.

**[0030]** В некоторых вариантах осуществления, первый профиль масс-спектрометрии и второй профиль масс-спектрометрии индивидуально представляют собой пептидный профиль. В некоторых вариантах осуществления, первый профиль масс-

спектрометрии и второй профиль масс-спектрометрии определяют с использованием такого же способа масс-спектрометрии.

**[0031]** Настоящее изобретение относится к способам характеристики рекомбинантного рецептора, включающим получение, с использованием способа масс-спектрометрии, профиля масс-спектрометрии с использованием по меньшей мере одного компонента данных для рекомбинантного рецептора, выделенного из образца из композиции модифицированных клеток или ее подгруппы, содержащей иммуноциты, экспрессирующие или содержащие рекомбинантный рецептор.

**[0032]** Настоящее изобретение относится к способам характеристики рекомбинантного рецептора, включающим получение профиля масс-спектрометрии рекомбинантного рецептора, с использованием способа масс-спектрометрии, для образца из тестируемой композиции модифицированных клеток, содержащей иммуноциты, экспрессирующие или содержащие рекомбинантный рецептор, где указанный профиль масс-спектрометрии включает по меньшей мере один компонент данных.

**[0033]** Настоящее изобретение относится к способам характеристики рекомбинантного рецептора, включающим: получение тестируемого профиля масс-спектрометрии, с использованием способа масс-спектрометрии, для образца из тестируемой композиции модифицированных клеток или ее подгруппы, содержащей иммуноциты, экспрессирующие или содержащие рекомбинантный рецептор; получение эталонного профиля масс-спектрометрии, с использованием способа масс-спектрометрии, для образца из эталонной композиции или ее подгруппы, содержащей иммуноциты, где указанный эталонный профиль масс-спектрометрии включает по меньшей мере один компонент данных; и идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в тестируемом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с эталонным профилем масс-спектрометрии.

**[0034]** В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает идентификацию одного или более различий по меньшей мере в одном компоненте данных, по сравнению с профилем масс-спектрометрии таких же клеток, но не экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

**[0035]** В некоторых вариантах осуществления, тестируемая композиция модифицированных клеток и эталонная композиция клеток являются по существу сходными, за исключением присутствия рекомбинантного рецептора, необязательно, где тестируемая композиция модифицированных клеток и эталонная композиция получены по существу сходным способом и/или содержат одинаковый тип иммуноцитов.

**[0036]** В некоторых вариантах осуществления, тестируемая композиция модифицированных клеток стимулирована в присутствии стимулирующего реагента. В некоторых вариантах осуществления, композиция модифицированных клеток содержит клетки, приведенные в контакт со средством для получения зависимой от рекомбинантного рецептора активности, необязательно, где средство представляет собой

антиген-мишень, способный к связыванию рекомбинантным рецептором, или представляет собой антиидиотипическое антитело, специфическое для антитела.

**[0037]** В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает идентификацию одного или более различий в профиле масс-спектрометрии, по сравнению с масс-спектрометрией такой же композиции модифицированных клеток, но которая не была стимулирована в присутствии стимулирующего реагента или была стимулирована в присутствии другого стимулирующего реагента.

**[0038]** В некоторых вариантах осуществления, композиция клеток обогащена иммунocyтaми. В некоторых вариантах осуществления, иммунocyтaы включают лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления, лимфоциты включают Т-клетки или клетки естественные киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления, лимфоциты включают Т-клетки, и Т-клетки представляют собой CD4+ и/или CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, иммунocyтaы являются человеческими.

**[0039]** Среди любых из представленных вариантов осуществления, любые из композиций клеток включают композицию клеток, обогащенную иммунocyтaми, например, посредством отбора, выделения или очистки иммунocyтoв из биологического образца, например, способами на основе иммуноаффинности. В некоторых вариантах осуществления, тестируемая композиция модифицированных клеток обогащена иммунocyтaми. В некоторых вариантах осуществления, эталонная композиция обогащена иммунocyтaми. В некоторых вариантах осуществления, эталонная композиция модифицированных клеток обогащена иммунocyтaми. В некоторых вариантах осуществления, композиция-источник обогащена иммунocyтaми. В некоторых вариантах осуществления, стимулированная композиция обогащена иммунocyтaми. В некоторых вариантах осуществления, трансформированная композиция обогащена иммунocyтaми. В некоторых вариантах осуществления, композиция модифицированных клеток обогащена иммунocyтaми. В некоторых вариантах осуществления, первая композиция клеток обогащена иммунocyтaми. В некоторых вариантах осуществления, вторая композиция клеток обогащена иммунocyтaми. В некоторых вариантах осуществления, культивированная композиция обогащена иммунocyтaми. В некоторых вариантах осуществления, каждая из тестируемой композиции модифицированных клеток и эталонной композиции обогащена иммунocyтaми. В некоторых вариантах осуществления, каждая из тестируемой композиции модифицированных клеток и эталонной модифицированной композиции обогащена иммунocyтaми. В некоторых вариантах осуществления, каждая из первой композиции клеток и второй композиции клеток обогащена иммунocyтaми.

**[0040]** В некоторых вариантах осуществления, иммунocyтaы представляют собой Т-клетки, необязательно, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, и стимулирующий реагент является способным активировать один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одного или более компонентов комплекса TCR, и/или один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одной или более костимулирующих молекул. В некоторых

вариантах осуществления, стимулирующий реагент включает первичное средство, которое специфически связывает член комплекса TCR, и вторичное средство, которое специфически связывает костимулирующую молекулу Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, первичное средство специфически связывает CD3 и/или костимулирующую молекулу, выбранную из группы, состоящей из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент включает антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело против CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент.

**[0041]** В некоторых вариантах осуществления, первичное и вторичное средства присутствуют на поверхности твердой подложки, необязательно, где твердая подложка представляет собой бусину. В некоторых вариантах осуществления, первичное и вторичное средства присутствуют на поверхности растворимого олигомерного реагента, включающего стрептавидин или мутеин стрептавидина.

**[0042]** В некоторых вариантах осуществления, культивирование проводят в условиях для стимуляции пролиферации и/или размножения модифицированных клеток.

**[0043]** В некоторых вариантах осуществления, образец перерабатывают из тестируемой композиции модифицированных клеток посредством мечения одного или более поверхностных белков, лизиса клеток и выделения одного или более белков. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает расщепление одного или более выделенных белков.

**[0044]** Настоящее изобретение относится к способам оценки поверхностных белков из композиции модифицированных клеток, включающим (a) мечение одного или более поверхностных белков, присутствующих на клетках из композиции модифицированных клеток или их подгруппе, где композиция модифицированных клеток содержит клетки, экспрессирующие или содержащие рекомбинантный рецептор, таким образом, получение композиции меченых клеток; (b) лизис клеток из композиции меченых клеток, таким образом, получение композиции лизированных клеток; (c) выделение одного или более поверхностных белков из композиции лизированных клеток для получения одного или более выделенных белков; и (d) подвергание одного или более выделенных белков способу масс-спектрометрии для получения профиля масс-спектрометрии, включающего один или более компонентов данных.

**[0045]** В некоторых вариантах осуществления, перед (d), способ дополнительно включает расщепление одного или более выделенных белков. В некоторых вариантах осуществления, расщепление проводят посредством протеолиза в присутствии одной или более протеаз, способных к разрезанию одной или более пептидных связей. В некоторых случаях, одна или более протеаз представляют собой или содержат трипсин.

**[0046]** В некоторых вариантах осуществления, один или более белков содержат мембранные белки поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, лизис клеток включает инкубацию в присутствии детергента. В некоторых вариантах осуществления, детергент представляет собой неионный детергент. В некоторых

вариантах осуществления, детергент представляет собой или содержит эффективное количество Triton X-100. В некоторых вариантах осуществления, детергент представляет собой денатурирующий детергент. В некоторых примерах, денатурирующий детергент представляет собой или содержит эффективное количество додецилсульфата натрия (SDS). В некоторых вариантах осуществления, после лизиса клеток, способ дополнительно включает удаление детергента из лизированной композиции.

**[0047]** В некоторых вариантах осуществления, мечение поверхностных белков включает биотиновое мечение первичных аминов. В некоторых примерах, один или более белков выделяют с использованием реагента, содержащего авидин, стрептавидин, NeutrAvidin™ или CaptAvidin™.

**[0048]** В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает подвергание образца жидкостной хроматографии (LC) с последующей масс-спектрометрией. В некоторых вариантах осуществления, жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографию (UHPLC), или сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC). В некоторых случаях, жидкостная хроматография представляет собой сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

**[0049]** В некоторых вариантах осуществления, жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию проводят поточным способом. В некоторых вариантах осуществления, жидкостная хроматография выбрана из нормальнофазовой (NP-), обращеннофазовой (RP) и хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC). В некоторых вариантах осуществления, масс-спектрометр, осуществляющий масс-спектрометрию, включает один или более из квадрупольного, содержащего ионную ловушку, времяпролетного (TOF) или использующего ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье масс-анализатора. В некоторых вариантах осуществления, масс-спектрометр включает содержащий ионную ловушку масс-анализатор, представляющий собой трехмерную квадрупольную ионную ловушку, цилиндрическую ионную ловушку, линейную квадрупольную ионную ловушку или масс-анализатор Orbitrap. В некоторых примерах, масс-спектрометр представляет собой квадрупольный масс-спектрометр Orbitrap.

**[0050]** В некоторых вариантах осуществления, компоненты данных выбраны из информации о MS ионов, общей ионной хроматограммы (TIC) или ее части, экстракционной ионной хроматограммы (XIC) или ее части, сигнального пика ионов при пептидной MS, сигнального пика ионов при белковой MS, идентификационной информации пептида, идентификационной информации белка, качественной информации, количественной информации, структурной информации, посттрансляционных модификаций. В некоторых вариантах осуществления, компонент данных представляет собой XIC или ее часть, где XIC или ее часть основана на одном или более теоретических или известных значениях  $m/z$  для одного или более пептидных компонентов рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, один или более

пептидных компонентов представляет собой протеолитически разрезанный или расщепленный пептидный компонент, необязательно, где протеаза представляет собой трипсин.

**[0051]** В некоторых из любых таких вариантов осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный рецептор антигена. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор является способным связывать антиген-мишень, ассоциированный с, специфический для и/или экспрессированный на клетке или ткани при заболевании, нарушении или состоянии. В некоторых примерах, заболевание, нарушение или состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, или опухоль или злокачественную опухоль. В некоторых аспектах, антиген-мишень представляет собой антиген опухоли. В некоторых примерах, антиген-мишень выбран среди интегрина  $\alpha\beta6$  (интегрин  $\alpha\text{v}\beta6$ ), 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 (STAG, 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), укороченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), 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 5D (GPCR5D), 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 $\alpha$ ), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 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.

**[0052]** В некоторых из любых таких вариантов осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не относящийся к TCR рецептор антигена или TCR, или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

**[0053]** В некоторых вариантах осуществления, образец происходит из композиции клеток или ее подгруппы, выбранной из (1) клеток в композиции клеток, (2) CD3+ клеток в композиции клеток; (3) CD4+ Т-клеток в композиции клеток; (4) CD8+ Т-клеток в композиции клеток; (5) рекомбинантный рецептор+ клеток в композиции клеток; (6) рекомбинантный рецептор+ CD3+ клеток в композиции клеток, (7) рекомбинантный рецептор+ CD8+ клеток в композиции клеток, или (8) рекомбинантный рецептор+ CD4+ клеток в композиции клеток, необязательно, где рекомбинантный рецептор представляет собой CAR.

**[0054]** Настоящее изобретение относится к композициям модифицированных клеток, полученным способом, в котором профиль масс-спектрометрии образца из композиции модифицированных клеток или ее подгруппы является изменчивым не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5% среди средних профилей масс-спектрометрии множества композиций модифицированных клеток, полученных этим способом, или изменяется от такого среднего не более чем на одно стандартное отклонение среди компонентов данных профиля масс-спектрометрии.

**[0055]** Настоящее изобретение относится к композициям модифицированных клеток, полученным способом, в котором уровень по меньшей мере одного компонента данных из профиля масс-спектрометрии, полученного с использованием способа масс-спектроскопии, для образца из композиции модифицированных клеток или ее подгруппы является изменчивым не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5% от уровня по меньшей мере одного компонента данных из эталонного профиля масс-спектрометрии на основании ряда профилей масс-

спектрометрии образцов из множества композиций модифицированных клеток, полученных этим способом, или отличается от такого эталона не более чем на стандартное отклонение уровня по меньшей мере компонента данных среди ряда профилей масс-спектрометрии.

**[0056]** В некоторых вариантах осуществления, композиция модифицированных клеток включает рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, композиция модифицированных клеток включает иммунциты.

**[0057]** В некоторых вариантах осуществления, способ получения композиции модифицированных клеток включает (i) отбор или выделение иммунцитов из образца от субъекта, таким образом, получение композиции-источника, необязательно, где биологический образец представляет собой образец после лейкофереза, образец после афереза или образец цельной крови; (ii) инкубацию клеток из композиции-источника с стимулирующим реагентом, таким образом, получение стимулированной композиции, где инкубацию, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов; (iii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, в иммунциты из стимулированной композиции, таким образом, получение трансформированной композиции; и (iv) культивирование стимулированной композиции при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов, таким образом, получение тестируемой композиции модифицированных клеток, где культивирование, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов.

**[0058]** В некоторых вариантах осуществления, композиция клеток обогащена иммунцитами. В некоторых вариантах осуществления, иммунциты включают лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления, лимфоциты включают Т-клетки или клетки естественные киллеры (NK). В некоторых примерах, лимфоциты включают Т-клетки, и Т-клетки представляют собой CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

**[0059]** В некоторых вариантах осуществления, композиция модифицированных клеток обогащена иммунцитами. В некоторых вариантах осуществления, композиция-источник обогащена иммунцитами. В некоторых вариантах осуществления, трансформированная композиция обогащена иммунцитами.

**[0060]** В некоторых вариантах осуществления, иммунциты являются человеческими.

**[0061]** В некоторых вариантах осуществления, иммунциты представляют собой Т-клетки, необязательно, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, и стимулирующий реагент является способным активировать один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одного или более компонентов комплекса TCR, и/или один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одной или более костимулирующих молекул. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент включает первичное средство, которое специфически связывает член комплекса TCR, и вторичное средство, которое специфически связывает костимулирующую молекулу Т-клетки. В некоторых случаях,

первичное средство специфически связывает CD3 и/или костимулирующую молекулу, выбранную из группы, состоящей из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

**[0062]** В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент включает антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело против CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, первичное и вторичное средства присутствуют на поверхности твердой подложки, необязательно, где твердая подложка представляет собой бусину. В некоторых вариантах осуществления, первичное и вторичное средства присутствуют на поверхности растворимого олигомерного реагента, включающего стрептавидин или мутеин стрептавидаина.

**[0063]** В некоторых вариантах осуществления, культивирование проводят в условиях для стимуляции пролиферации и/или размножения модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, образец перерабатывают из композиции модифицированных клеток посредством мечения одного или более поверхностных белков, лизиса клеток и выделения одного или более белков. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает расщепление одного или более выделенных белков. В некоторых вариантах осуществления, расщепление проводят посредством протеолиза в присутствии одной или более протеаз, способных к разрезанию одной или более пептидных связей.

**[0064]** В некоторых вариантах осуществления, одна или более протеаз представляют собой или содержат трипсин. В некоторых вариантах осуществления, один или более белков включают мембранные белки поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, лизис клеток включает инкубацию в присутствии детергента. В некоторых примерах, детергент представляет собой неионный детергент.

**[0065]** В некоторых вариантах осуществления, детергент представляет собой или содержит эффективное количество Triton X-100. В некоторых случаях, детергент представляет собой денатурирующий детергент. В некоторых вариантах осуществления, денатурирующий детергент представляет собой или содержит эффективное количество додецилсульфата натрия (SDS). В некоторых вариантах осуществления, после лизиса клеток, способ дополнительно включает удаление детергента из лизированной композиции.

**[0066]** В некоторых вариантах осуществления, мечение поверхностных белков включает биотиновое мечение первичных аминов.

**[0067]** В некоторых вариантах осуществления, один или более белков выделяют с использованием реагента, содержащего авидин, стрептавидин, NeutrAvidin™ или CaptAvidin™.

**[0068]** В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает подвергание образца жидкостной хроматографии (LC) с последующей масс-спектрометрией. В некоторых примерах, жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), сверхвысокоэффективную

жидкостную хроматографию (UHPLC) или сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC). В некоторых вариантах осуществления, жидкостная хроматография представляет собой сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC). В некоторых случаях, жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию проводят поточным способом. В некоторых вариантах осуществления, жидкостная хроматография выбрана из нормальнофазовой (NP-), обращеннофазовой (RP) и хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC).

**[0069]** В некоторых вариантах осуществления, масс-спектрометр, осуществляющий масс-спектрометрию, включает один или более из квадрупольного, содержащего ионную ловушку, времяпролетного (TOF) или использующего ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье масс-анализатора. В некоторых вариантах осуществления, масс-спектрометр включает содержащий ионную ловушку масс-анализатор, представляющий собой трехмерную квадрупольную ионную ловушку, цилиндрическую ионную ловушку, линейную квадрупольную ионную ловушку, или масс-анализатор Orbitrap. В некоторых вариантах осуществления, масс-спектрометр представляет собой квадрупольный масс-спектрометр Orbitrap.

**[0070]** В некоторых вариантах осуществления, компоненты данных выбраны из информации о MS ионов, общей ионной хроматограммы (TIC) или ее части, экстракционной ионной хроматограммы (XIC) или ее части, сигнального пика ионов при пептидной MS, сигнального пика ионов при белковой MS, идентификационной информации пептида, идентификационной информации белка, качественной информации, количественной информации, структурной информации, посттрансляционных модификаций. В некоторых вариантах осуществления, компонент данных представляет собой XIC или ее часть, где XIC или ее часть основана на одном или более теоретических или известных значениях  $m/z$  для одного или более пептидных компонентов рекомбинантного рецептора.

**[0071]** В некоторых вариантах осуществления, один или более пептидных компонентов представляет собой протеолитически разрезанный или расщепленный пептидный компонент, необязательно, где протеаза представляет собой трипсин.

**[0072]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой или включает химерный рецептор и/или рекомбинантный рецептор антигена. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор является способным связывать антиген-мишень, ассоциированный с, специфический для и/или экспрессированный на клетке или ткани при заболевании, нарушении или состоянии. В некоторых случаях, заболевание, нарушение или состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, или опухоль или злокачественную опухоль.

**[0073]** В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген опухоли. В некоторых примерах, антиген-мишень выбран среди интегрина  $\alpha\beta6$  (интегрин  $\alpha\text{v}\beta6$ ), антигена созревания В-клеток (BCMA), V7-N3, V7-N6, 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), укороченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), 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 5D (GPCR5D), 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 $\alpha$ ), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 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, мышинового 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 Вильямса 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.

**[0074]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой или включает функциональный не относящийся к TCR рецептор

антигена, или TCR, или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

**[0075]** Настоящее изобретение относится к способам оценки реагента, используемого в способе получения композиции модифицированных клеток, включающим сравнение профиля масс-спектрометрии образца из первого реагента с эталонным профилем масс-спектрометрии реагента, где профиль масс-спектрометрии получен с использованием способа масс-спектрометрии; и идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в тестируемом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с эталонным профилем масс-спектрометрии, таким образом, идентификацию профиля масс-спектрометрии реагента. В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонного реагента или представляет собой средний профиль масс-спектров ряда образцов из множества различных партий реагента. В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии представляет собой средний профиль масс-спектрометрии образца из множества различных партий реагента.

**[0076]** В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает определение присутствия, отсутствия или уровня изменчивости или дисперсии профиля масс-спектрометрии образца от среднего профиля масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает выбор реагента, если изменчивость или дисперсия профиля масс-спектрометрии среди множества различных партий реагента составляет не более чем 40%, не более чем 30%, не более чем 20%, не более чем 10% или не более чем 5%, или изменяется от такого среднего не более чем на одно стандартное отклонение среди компонентов данных профиля масс-спектрометрии.

**[0077]** В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает выбор реагента, если величина изменчивости в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных среди ряда профилей масс-спектрометрии составляет не более чем 40%, не более чем 30%, не более чем 20%, не более чем 10%, или не более чем 5% от уровня по меньшей мере одного компонента данных в эталонном профиле масс-спектрометрии.

**[0078]** В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает выбор реагента, если уровень по меньшей мере одного компонента данных тестируемого профиля масс-спектрометрии является изменчивым не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5% от уровня по меньшей мере одного компонента данных из эталонного профиля масс-спектрометрии, или изменяется от такого уровня не более чем на стандартное отклонение уровня по меньшей мере компонента данных среди ряда профилей масс-спектрометрии.

**[0079]** В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает подвергание образца жидкостной хроматографии (LC) с последующей масс-

спектрометрией. В некоторых вариантах осуществления, жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографию (UHPLC), или сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC). В некоторых случаях, жидкостная хроматография представляет собой сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

**[0080]** В некоторых вариантах осуществления, жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию проводят поточным способом. В некоторых вариантах осуществления, жидкостная хроматография выбрана из нормальнофазовой (NP-), обращеннофазовой (RP) и хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC). В некоторых вариантах осуществления, масс-спектрометр, осуществляющий масс-спектрометрию, включает один или более из квадрупольного, содержащего ионную ловушку, времяпролетного (TOF) или использующего ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье масс-анализатора.

**[0081]** В некоторых вариантах осуществления, масс-спектрометр содержит содержащий ионную ловушку масс-анализатор, представляющий собой трехмерную квадрупольную ионную ловушку, цилиндрическую ионную ловушку, линейную квадрупольную ионную ловушку, или масс-анализатор Orbitrap. В некоторых вариантах осуществления, масс-спектрометр представляет собой квадрупольный масс-спектрометр Orbitrap.

**[0082]** В некоторых вариантах осуществления, компоненты данных выбраны из информации о MS ионов, общей ионной хроматограммы (TIC) или ее части, экстракционной ионной хроматограммы (XIC) или ее части, сигнального пика ионов при пептидной MS, сигнального пика ионов при белковой MS, идентификационной информации пептида, идентификационной информации белка, качественной информации, количественной информации, структурной информации, посттрансляционных модификаций.

**[0083]** В некоторых вариантах осуществления, реагент представляет собой реагент, способный стимулировать сигнал в клетках из композиции клеток, необязательно, композиции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки из композиции клеток содержат рекомбинантный рецептор, необязательно химерный рецептор антигена. В некоторых вариантах осуществления, реагент является способным стимулировать или индуцировать зависимую от рекомбинантного рецептора активность в клетках из композиции клеток.

#### Краткое описание чертежей

**[0084]** На **ФИГ. 1А** и **1В** показаны иллюстративные прочтения из анализа масс-спектрометрии белков поверхности клетки, выделенных из идентифицированных композиций-источников Т-клеток (CAR-) и композиций модифицированных (CAR+) Т-клеток. На **ФИГ. 1А** показана иллюстративная общая ионная хроматограмма (TIC), представляющая пептидные ионы белков поверхности клетки. На **ФИГ. 1В** показана

иллюстративная экстракционная ионная хроматограмма (XIC) для пептидных пиков, ассоциированных с внеклеточными и внутриклеточными частями CAR из модифицированных композиций и композиций-источников Т-клеток.

[0085] На **ФИГ. 2** показаны профили анализа LC для трех индивидуальных белков, присутствующих в реагенте, включая белок с посттрансляционной модификацией (PTM), выделенный из трех различных партий иллюстративного необработанного материала, используемого в способе получения модифицированных (CAR+) композиций Т-клеток, и отношения массы к заряду ( $m/z$ ) для совместно элюированных белков.

[0086] На **ФИГ. 3** показан анализ масс-спектрометрии относительного процента белка 2 (с посттрансляционными модификациями (PTM)) и белка 3 в трех различных титруемых образцах необработанного реагента, используемого в способе получения композиций модифицированных (CAR+) Т-клеток.

[0087] На **ФИГ. 4А-С** показаны хроматограммы, полученные посредством HILIC-LC и тандемной MS для N-гликанов, высвобожденных из цельных интактных CD3+ активированных Т-клеток после обработки PNGазой F. На **ФИГ. 4А** показана хроматограмма HILIC-FLR для высвобожденных посредством PNGазы F N-гликанов из композиции активированных CD3+ Т-клеток. На **ФИГ. 4В** показана экстракционная ионная хроматограмма (XIC), полученная на первой стадии тандемной MS для иллюстративного N-гликана, A3S3F (теоретическая масса 1113,0933), в+3 заряженном состоянии с использованием допуска по массе 5 м.д. На **ФИГ. 4С** показана фрагментация MS/MS дополнительного иллюстративного N-гликана, A3S4F (теоретическая масса 1210,4614), полученная на второй стадии тандемной MS. Пунктирные рамки на **ФИГ. 4С** показывают различные связи остатка n-ацетилглюкозамина.

#### Подробное описание

[0088] Настоящее изобретение относится к способам идентификации профилей масс-спектрометрии композиций клеток, включая композиции генетически модифицированных клеток, например, композиции аутологичных CAR-Т-клеток. В некоторых аспектах, представленные способы включают определение профиля масс-спектрометрии (например, тестируемого профиля масс-спектрометрии) образца из композиции модифицированных клеток с использованием способа масс-спектрометрии. В некоторых аспектах, композиция модифицированных клеток содержит или включает клетки, содержащие рекомбинантный рецептор (например, CAR). В конкретных аспектах, профиль масс-спектрометрии сравнивают с эталонным профилем масс-спектрометрии, таким как эталонный профиль масс-спектрометрии образца или полученный для образца из композиции, используемой в качестве эталонной (например, эталонной композиции клеток), определенным с использованием такого же способа масс-спектрометрии, таким образом, чтобы идентифицировать одно или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного вида пептида, включая его посттрансляционные модификации, в тестируемом профиле масс-спектрометрии по сравнению с эталонным профилем масс-спектрометрии.

**[0089]** Настоящее изобретение относится также к способам характеристики процесса, например, производственного процесса, для получения композиции генетически модифицированных клеток. В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии композиций клеток, полученные на различных стадиях процесса, анализируют для характеристики процесса, или, в некоторых аспектах, для характеристики изменений, которым подвергались клетки в ходе процесса. В некоторых аспектах, профили масс-спектрометрии композиций модифицированных клеток, полученных в результате различных процессов, например, производственных процессов для получения модифицированных клеток, анализируют для характеристики процессов, или, в некоторых аспектах, для характеристики сходства или различий композиций клеток, полученных различными способами.

**[0090]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способам оценки способа получения композиции генетически модифицированных клеток. В некоторых аспектах, способы представляют собой или включают получение среднего профиля масс-спектрометрии образца из множества эталонных композиций модифицированных клеток или его подгруппы и определение присутствия, отсутствия или уровня изменчивости или дисперсии среднего профиля масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, множество эталонных композиций содержат клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, полученные таким же способом или по существу таким же способом.

**[0091]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способам оценки способа получения композиции генетически модифицированных клеток. В некоторых аспектах, способы представляют собой или включают получение ряда профилей масс-спектрометрии образцов из множества эталонных композиций модифицированных клеток или его подгруппы, получение их среднего профиля масс-спектрометрии, и определение присутствия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного вида пептида, включая его посттрансляционные модификации, в среднем профиле масс-спектрометрии. В некоторых аспектах, способы дополнительно включают определение величины изменчивости или дисперсии уровня по меньшей мере одного вида пептида, включая его посттрансляционные модификации, среди множества профилей масс-спектрометрии. В некоторых аспектах, величина изменчивости или дисперсии уровня по меньшей мере одного вида пептида сравнивают со средним уровнем по меньшей мере одного вида пептида, таким образом, определение степени изменчивости среди образцов. В некоторых вариантах осуществления, множество эталонных композиций содержат клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, полученные таким же способом или по существу таким же способом.

**[0092]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способам оценки способа получения композиции генетически модифицированных клеток. В некоторых аспектах, способы представляют собой или включают получение ряда профилей масс-спектрометрии образцов из множества эталонных композиций модифицированных клеток или его подгруппы и определение величины изменчивости или дисперсии уровня по

меньшей мере одного вида пептида, включая его посттрансляционные модификации, среди множества профилей масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, множество эталонных композиций содержат клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, полученные таким же способом или по существу таким же способом.

**[0093]** Настоящее изобретение относится также к способам характеристики способа получения генетически модифицированных клеток или композиций клеток. В некоторых аспектах, способы включают получение первого и второго профиля масс-спектрометрии образцов из различных композиций клеток с использованием способа масс-спектрометрии и идентификации одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в профилях масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, композиции клеток представляют собой или содержат композиции на различных стадиях производственного процесса для получения композиции генетически модифицированных клеток. В конкретных вариантах осуществления, композиции содержат генетически модифицированные клетки, полученные различными способами.

**[0094]** В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для оценки или характеристики рекомбинантного рецептора, например, посредством получения профиля масс-спектрометрии рекомбинантного рецептора с использованием способа масс-спектрометрии, для образца. В некоторых вариантах осуществления, образец получен из тестируемой композиции модифицированных клеток или ее подгруппы, содержащей иммуноциты, экспрессирующие или содержащие рекомбинантный рецептор, где указанный профиль масс-спектрометрии содержит по меньшей мере один компонент данных.

**[0095]** Дополнительные способы, представленные в настоящем описании, можно использовать для анализа или оценки поверхностных белков из композиции модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, такие способы включают стадии мечения одного или более поверхностных белков, присутствующих на клетках из композиции модифицированных клеток или их подгруппе, лизиса клеток из композиции меченых клеток, выделения поверхностных белков и затем подвергания выделенных белков способу масс-спектрометрии. В некоторых аспектах, способами получают профиль масс-спектрометрии, содержащий компоненты данных, такие как компоненты, относящиеся к одному или более поверхностным белкам, включая некоторые случаи рекомбинантного рецептора или CAR.

**[0096]** Конкретные варианты осуществления предусматривают, что виды клеточной терапии, и в частности, адоптивной Т-клеточной терапии, представляют собой мощную технологию для лечения, облегчения, и/или смягчения различных заболеваний, таких как злокачественная опухоль. Современные аналитические инструменты, доступные для анализа или характеристики терапевтических или фармацевтических композиций клеток, включают проверку маркеров клеточной поверхности или внутренних маркеров например, посредством проточной цитометрии, или экспрессии гена, такими способами,

как РНК-секвенирование (RNA-seq) или АТАС-seq. В то время как такие способы можно использовать в некоторых аспектах для анализа или характеристики композиций клеток, эти способы не лишены ограничений. Например, в некоторых аспектах, детекция экспрессии белка, например, посредством способов на основе проточной цитометрии, может быть ограничена количеством различных индивидуальных маркеров, которые можно проверять в одном эксперименте. В некоторых аспектах, такие анализы должны фокусироваться на мишенях, которые, по прогнозам или гипотезам, изменяются в определенных условиях, из-за ограниченного количества мишеней, которые можно оценивать. И наоборот, анализы экспрессии генов посредством РНК-секвенирования или АТАС-seq подходят для полногеномного скрининга, позволяя несмещенную детекцию мишеней, на которые могут влиять определенные условия. Однако, ограничением этих способов является то, что изменения на уровне экспрессии гена не всегда коррелируют с изменениями на уровне функциональной экспрессии белка.

**[0097]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к несмещенным способам, которые можно использовать для детекции, идентификации и/или количественной оценки белков, таких как белки поверхности клеток, присутствующие в композиции клеток. В конкретных аспектах, преимуществом представленных способов является то, что эти способы можно использовать для детекции изменений белка, например, поверхностного белка, в различных условиях без необходимости выбора или прогнозирования специфических мишеней до анализа. В некоторых аспектах, дополнительным преимуществом представленных способов является то, что эти способы позволяют анализ белков, таких как функциональные поверхностные белки, в широких масштабах. Таким образом, в некоторых аспектах, представленные способы являются пригодными для использования, либо отдельно, либо в комбинации с существующими способами, для анализа или характеристики композиций клеток, таких как композиции для клеточной терапии.

**[0098]** В некоторых аспектах, препараты для клеточной терапии, например, препараты для CAR-T-клеточной терапии, представляют собой живые клетки, которые получены от субъектов и модифицированы для получения конечного лекарственного препарата. Таким образом, в отличие от малых молекул или традиционных биологических средств, может, в некоторых случаях, являться сложным получение единообразно модифицированных композиций для клеточной терапии, пригодных для введения субъекту. Например, в некоторых аспектах, клетки, происходящие от различных индивидуальных пациентов, страдающих от конкретного заболевания, могут являться изменчивыми по конкретным признакам, таким как общее состояние, жизнеспособность, активность и пролиферативная способность клеток. Такие различия могут быть обусловлены различными степенями или изменчивостью заболевания среди пациентов, или в некоторых аспектах, могут быть обусловлены различным генетическим фоном или фоном окружающей среды пациентов. В некоторых аспектах, любые различия между композициями клеток, полученных от субъектов, могут усугубляться различными

реакциями на способ модификации. В некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для оценки изменчивости или дисперсии клеточной терапии, полученной среди множества субъектов, или чтобы убедиться, что индивидуальная композиция клеток находится в пределах приемлемого допуска по сравнению с идеальным или эталонным стандартом, до проведения клеточной терапии.

**[0099]** В некоторых аспектах, в представленных способах используют масс-спектрометрию для характеристики некоторых или всех белков поверхности клеток, присутствующих в клетках из композиции клеток, таким образом, позволяя оценивать различные признаки клеток все одновременно. В некоторых аспектах, представленными способами идентифицируют и измеряют уровень или количество индивидуальных поверхностных белков, присутствующих на клетках. Этот способ можно использовать, среди прочего, для мониторинга изменений, возникающих среди индивидуальных композиций клеток в ходе способа модификации, или для подтверждения идентичности и качества препарата для клеточной терапии до подвергания пациента клеточной терапии. В конкретных аспектах, преимуществом представленных способов является то, что этими способами можно детектировать изменения, которые можно пропустить с использованием способов, ограниченных анализом только нескольких белков-мишеней за один раз, таких как способы, основанные на мечении антителом для детекции белков.

**[0100]** В конкретных аспектах, одного маркера или поверхностного белка может быть недостаточно для детекции степени, в которой Т-клетка может иметь конкретное свойство. Преимуществом представленных способов является то, что изменения множества маркеров, ассоциированных со свойством, можно оценивать в одно и то же время, таким образом, позволяя детекцию изменений среди континуума нескольких различных свойств в рамках одной оценки.

**[0101]** Представленные в настоящем описании способы показывают, что профили масс-спектрометрии можно успешно получать для композиций клеток, таких как композиции для клеточной терапии. В некоторых аспектах, профили масс-спектрометрии позволяют дальнейшие исследования компонентов данных, ассоциированных с одним или более белками или пептидами из композиции модифицированных клеток, включая их посттрансляционные модификации, для характеристики препаратов для клеточной терапии и влияния, которые различные способы модификации могут оказывать на клетки.

**[0102]** Особенное преимущество представленных способов включает высокую степень разрешения, достигаемого для детекции и измерения множества белков-мишеней в образце. В некоторых аспектах, эта высокая степень чувствительности позволяет детекцию и количественную оценку посттрансляционных модификаций, таких как конъюгация гликанов с белками. В некоторых аспектах, измерения или количественную оценку посттранскрипционных модификаций можно сравнивать с другими прочтениями для образцов, такими как геномные прочтения, полученные посредством РНК-секвенирования или анализа доступного для транспозазы хроматина с использованием секвенирования (АТАС-seq). Такие сравнения могут быть использованы, среди прочего,

для идентификации или оценки, каким образом изменения ферментов на геномном уровне могут влиять на специфические посттрансляционные модификации, и могут, в некоторых случаях, являться полезными для разработки дополнительных анализов для оценки свойств или функциональности клеток. Например, в некоторых аспектах, представленные способы можно использовать для детекции гликозилирования белков поверхности клетки, и такие данные могут коррелировать с экспрессией индивидуальных генов гликотрансфераз. В некоторых аспектах, такую корреляцию можно использовать для идентификации или определения, каким образом изменения на генетическом уровне влияют на функцию клетки.

**[0103]** В конкретных аспектах, представленные способы включают масс-спектрометрию для получения мощного инструмента для анализа сложных смесей. В некоторых аспектах, наблюдали, что, в некоторых случаях, изменения условий хранения или манипуляций для необработанного материала(материалов) или реагента(реагентов), или различных партий необработанного материала(материалов) или реагента(реагентов), используемых в способе получения модифицированной композиции Т-клеток - в сходном в ином отношении способе модификации клеток - могут коррелировать, в конечной модифицированной композиции, с конкретными параметрами, ассоциированными с измененной или изменчивой активностью продукта модифицированных Т-клеток. (Публикация заявки РСТ No. WO2018/157171). Например, в некоторых аспектах, разработка, получение или модификация препаратов для клеточной терапии могут требовать комплексных реагентов, таких как реагенты, которые представляют собой или включают один или более белков. В некоторых аспектах, для реагентов, соответствующим всем критериям выпуска поставщика, могут показывать изменчивость между партиями и таким образом, в некоторых аспектах, они могут требовать дополнительного скрининга, чтобы убедиться, что реагенты не вносят вклад в нежелательную изменчивость или дисперсию препаратов для клеточной терапии. Представленные способы обеспечивают дополнительные средства для исследования таких сложных смесей для идентификации потенциальных изменений в препаратах для клеточной терапии или реагентах, чтобы убедиться, что препараты для клеточной терапии или реагенты являются пригодными и безопасными для использования.

**[0104]** В некоторых аспектах, представленные способы можно эффективно использовать анализы на основе масс-спектрометрии, например, LC-MS, для идентификации различий (или их отсутствия) между партиями необработанного материала реагентов, например, реагентов, используемых для генетической инженерии композиций клеток, на уровне белка. В некоторых аспектах, анализы на основе масс-спектрометрии могут являться достаточно чувствительными для детекции различия между производственными партиями, включая различия, которые могут не влиять на взаимодействия между реагентом и клетками. Однако, в некоторых аспектах, представленные способы позволяют сфокусироваться на подгруппе биологически значимых различий. Таким образом, в некоторых аспектах, в то время как представленные

способы обеспечивают несмещенный анализ композиции клеток или реагента, полученные наборы данных, например, профили масс-спектрометрии, можно использовать для оценки подгруппы белков-мишеней, которые, по прогнозам или гипотезам, являются биологически значимыми.

**[0105]** 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.

**[0106]** Заголовки разделов, используемые в настоящем описании, приведены только с целью организации, и их не следует рассматривать как ограничивающие описанный объект.

## **I. АНАЛИЗ КОМПОЗИЦИЙ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ:**

**[0107]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способам идентификации профиля масс-спектрометрии (MS) композиции клеток, такой как композиция генетически модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки экспрессируют рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор или CAR. В конкретных вариантах осуществления, способы включают стадию определения профиля масс-спектрометрии, например, тестируемого профиля масс-спектрометрии, для образца из композиции модифицированных клеток (например, тестируемой композиции клеток) с использованием способа масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, тестируемый профиль масс-спектрометрии сравнивают с эталонным профилем масс-спектрометрии, например, для идентификации различий между одним или более компонентами данных профилей масс-спектрометрии.

**[0108]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится также к способам идентификации профиля масс-спектрометрии (MS) композиции генетически модифицированных клеток, включающим: (a) определение тестируемого профиля масс-спектрометрии образца из тестируемой композиции модифицированных клеток с использованием способа масс-спектрометрии, где указанная тестируемая композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты, содержащие рекомбинантный рецептор; (b) сравнение тестируемого профиля масс-спектрометрии с эталонным профилем масс-спектрометрии; и (c) идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в тестируемом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с эталонным профилем масс-

спектрометрии, таким образом, идентификацию профиля масс-спектрометрии композиции клеток, содержащей рекомбинантный рецептор.

#### **А. Профиль масс-спектрометрии**

**[0109]** В некоторых аспектах, масс-спектрометрия (MS) представляет собой мощный аналитический инструмент, способный к сбору огромного количества данных для образца. В конкретных аспектах, масс-спектрометрия (например, как описано очень упрощенным образом) включает детекцию ионов, полученных из образца, в соответствии с их отношениями массы к заряду ( $m/z$ ). В конкретных аспектах, сигналы MS от ионов используют для получения масс-спектров, представляющих относительную распространенность ионов образца, или их фрагментов, как функции их отношения  $m/z$ . В конкретных вариантах осуществления, данные, полученные из одного анализа или серий анализов масс-спектрометрии, можно впоследствии анализировать, например, сравнивать с данными, полученными для другого образца или другого анализа масс-спектрометрии, при любом количестве информативных уровней полученных данных, включая уровни любой комбинации информации о MS ионов, информации об идентификации/последовательности пептида и/или белка, информации о посттрансляционной модификации и информации о количественной оценке. В способах, описанных в настоящем описании, профиль масс-спектрометрии образца или композиции клеток может содержать по меньшей мере один компонент данных, выбранный из любого одного информативного уровня или любой комбинации информативных уровней данных, полученных из одного анализа или серий анализов масс-спектрометрии, включая любой компонент данных из любого последующего анализа полученных данных сигнала MS и полученную из него информацию. В некоторых вариантах осуществления, компонент данных представляет собой одну точку данных, такую как присутствие идентифицированного пептида или количество идентифицированного пептида, включая его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, компонент данных представляет собой коллекцию точек данных, таких как присутствие множества пептидов или количество множества пептидов, включая их посттрансляционные модификации.

**[0110]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий информацию о MS ионов, такую как сигнал MS иона. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий информацию о MS ионов одного или более видов белка и/или пептида, включая их посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий информацию о MS ионов одного или более видов ионов белка и/или пептида, включая их посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий информацию о MS ионов одного или более видов фрагментов белка и/или пептида, включая их посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль

масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий информацию о MS ионов одного или более видов фрагментов ионов белка и/или пептида, включая их посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий информацию о MS ионов из одного или более анализов MS, или их части. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий хроматограмму общего ионного тока. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий хроматограмму общего ионного тока из более, чем одного анализа MS. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий часть хроматограммы общего ионного тока.

**[0111]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий информацию о MS ионов, подвергнутой манипуляции для включения и/или исключения одного или более MS ионов. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму (XIC или EIC). В конкретных аспектах, способы получения экстракционных ионных хроматограмм хорошо известны в данной области, и включают выделение информации о MS ионов из анализа MS для одного или более представляющих интерес значений  $m/z$ , например, значений  $m/z$ , коррелирующих с одним или более представляющими интерес пептидами. В некоторых вариантах осуществления, представляющее интерес значение  $m/z$  включает допуск диапазона  $m/z$ , например, окно  $m/z$ , включающее представляющее интерес значение  $m/z$ . В некоторых вариантах осуществления, допуск диапазона  $m/z$  обусловлен масс-спектрометром, используемым для получения профиля масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, допуск диапазона  $m/z$  составляет менее, чем приблизительно 50 м.д., например, менее, чем приблизительно любое из 40 м.д., 30 м.д., 20 м.д., 10 м.д. или 5 м.д. В некоторых вариантах осуществления, допуск диапазона  $m/z$  составляет приблизительно 50 м.д., например, приблизительно любое из 40 м.д., 30 м.д., 20 м.д., 10 м.д. или 5 м.д..

**[0112]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на свойстве представляющих интерес одного или более видов белков и/или одного или более видов пептидов, включая их посттрансляционные модификации, таком как  $m/z$  MS иона представляющих интерес одного или более видов белков и/или одного или более видов пептидов, включая их посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на одном или более заряженных состояниях представляющих интерес одного или более видов белков и/или одного или более видов пептидов, включая их посттрансляционные модификации. В

некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на теоретической информации о MS ионов. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на информации *in silico* о MS ионов. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на информации *in silico* о MS ионов, представляющей теоретически расщепленный протеазой белок. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на экспериментальной информации о MS ионов.

**[0113]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на свойстве рекомбинантного рецептора, таком как  $m/z$  MS иона рекомбинантного рецептора, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на информации *in silico* о MS ионов, представляющей теоретически расщепленный протеазой рекомбинантный рецептор, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на экспериментальной информации о MS ионов рекомбинантного рецептора, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на свойстве трансмембранного белка, таком как  $m/z$  MS иона трансмембранного белка, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на информации *in silico* о MS ионов представляющей теоретически расщепленный протеазой трансмембранный белок, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на экспериментальной информации о MS ионов трансмембранного белка, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную

хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на свойстве белка поверхности клеток, таком как  $m/z$  MS иона белка поверхности клеток, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на информации *in silico* о MS ионов, представляющей теоретически расщепленный протеазой белок поверхности клеток, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на экспериментальной информации о MS ионов белка поверхности клеток, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на свойстве химерного рецептора антигена (CAR), таком как  $m/z$  MS иона CAR, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на информации *in silico* о MS ионов, представляющей теоретически расщепленный протеазой CAR, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий экстракционную ионную хроматограмму, где информация об экстрагированных ионах основана на экспериментальной информации о MS ионов CAR, включая любые его посттрансляционные модификации.

**[0114]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий один или более сигнальных пиков ионов при пептидной MS. В некоторых вариантах осуществления, один или более сигнальных пиков ионов при пептидной MS содержит одно или более заряженных состояний пептида, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, один или более сигнальных пиков ионов при пептидной MS содержит одно или более заряженных состояний пептида, включая любые его посттрансляционные модификации, где пептид происходит из рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, один или более сигнальных пиков ионов при пептидной MS содержит одно или более заряженных состояний пептида, включая любые его посттрансляционные модификации, где пептид происходит из трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления, один или более сигнальных пиков ионов при пептидной MS содержит одно или более заряженных состояний пептида, включая любые его посттрансляционные модификации, где пептид происходит из белка поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, один или более сигнальных пиков ионов при пептидной MS содержит одно или более заряженных состояний пептида, включая

любые его посттрансляционные модификации, где пептид происходит из химерного рецептора антигена (CAR).

**[0115]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий один или более сигнальных пиков ионов при белковой MS. В некоторых вариантах осуществления, один или более сигнальных пиков ионов при белковой MS содержит одно или более заряженных состояний белка, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, один или более сигнальных пиков ионов при белковой MS содержит одно или более заряженных состояний белка, включая любые его посттрансляционные модификации, где белок происходит из рекомбинантного рецептора или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, один или более сигнальных пиков ионов при белковой MS содержит одно или более заряженных состояний белка, включая любые его посттрансляционные модификации, где белок происходит из трансмембранного белка или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, один или более сигнальных пиков ионов при белковой MS содержит одно или более заряженных состояний белка, включая любые его посттрансляционные модификации, где белок происходит из белка поверхности клеток или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, один или более сигнальных пиков ионов при белковой MS содержит одно или более заряженных состояний белка, включая любые его посттрансляционные модификации, где белок происходит из химерного рецептора антигена (CAR) или его фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий идентификационную информацию пептида. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит идентичность одного или более пептидов, включая любые их посттрансляционные модификации, включая любую характеристику, свойство или наблюдение идентифицированного пептида, полученные из анализа способом масс-спектрометрии, например, распространенность и время элюции из жидкостного хроматографа. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит идентичность одного или более пептидов, включая любые их посттрансляционные модификации, из одного белка. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит идентичность предварительно выбранной подгруппы пептидов, включая любые их посттрансляционные модификации, из белка. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит информацию об аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит идентичность одного или более пептидов, включая любые их посттрансляционные модификации, из рекомбинантного рецептора, включая любую характеристику, свойство или наблюдение идентифицированного пептида, полученные из анализа способом масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит идентичность предварительно выбранной подгруппы пептидов,

включая любые их посттрансляционные модификации, из рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит информацию об аминокислотной последовательности рекомбинантного рецептора, включая любые его посттрансляционные модификации, или один или более его фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит идентичность одного или более пептидов, включая любые их посттрансляционные модификации, из трансмембранного белка, включая любую характеристику, свойство или наблюдение идентифицированного пептида, полученные из анализа способом масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит идентичность предварительно выбранной подгруппы пептидов, включая любые их посттрансляционные модификации, из трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит информацию об аминокислотной последовательности трансмембранного белка, включая любые его посттрансляционные модификации, или один или более его фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит идентичность одного или более пептидов, включая любые их посттрансляционные модификации, из белка поверхности клеток, включая любую характеристику, свойство или наблюдение идентифицированного пептида, полученные из анализа способом масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит идентичность предварительно выбранной подгруппы пептидов, включая любые их посттрансляционные модификации, из белка поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит информацию об аминокислотной последовательности белка поверхности клеток, включая любые его посттрансляционные модификации, или один или более его фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит идентичность одного или более пептидов, включая любые их посттрансляционные модификации, из химерного рецептора антигена (CAR), включая любую характеристику, свойство или наблюдение идентифицированного пептида, полученные из анализа способом масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит идентичность предварительно выбранной подгруппы пептидов из CAR, включая любые их посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация пептида содержит информацию об аминокислотной последовательности белка CAR, включая любые его посттрансляционные модификации, или один или более его фрагментов.

**[0116]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий идентификационную информацию белка. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация белка содержит идентичность одного или более белков, включая любые их посттрансляционные модификации, включая любую характеристику, свойство или наблюдение

идентифицированного белка, полученные из анализа способом масс-спектрометрии, например, распространенность и время элюции из жидкостного хроматографа. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация белка содержит идентичность одного или более рекомбинантных рецепторов, включая любые их посттрансляционные модификации, включая любую характеристику, свойство или наблюдение одного или более рекомбинантных рецепторов, полученные из анализа способом масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация белка содержит идентичность предварительно выбранной подгруппы рекомбинантных рецепторов, включая любые их посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация белка содержит информацию об аминокислотной последовательности рекомбинантного рецептора, включая любые его посттрансляционные модификации, или один или более его фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация белка содержит идентичность одного или более трансмембранных белков, включая любые их посттрансляционные модификации, включая любую характеристику, свойство или наблюдение одного или более трансмембранных белков, полученные из анализа способом масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация белка содержит идентичность предварительно выбранной подгруппы трансмембранных белков, включая любые их посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация белка содержит информацию об аминокислотной последовательности трансмембранного белка, включая любые его посттрансляционные модификации, или один или более его фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация белка содержит идентичность одного или более белков поверхности клеток, включая любые его посттрансляционные модификации, включая любую характеристику, свойство или наблюдение одного или более белков поверхности клеток, полученные из анализа способом масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация белка содержит идентичность предварительно выбранной подгруппы белков поверхности клетки, включая любые их посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация белка содержит информацию об аминокислотной последовательности белка поверхности клеток, включая любые его посттрансляционные модификации, или один или более его фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация белка содержит идентичность одного или более химерных рецепторов антигенов (CAR), включая любые их посттрансляционные модификации, включая любую характеристику, свойство или наблюдение одного или более CAR, полученные из анализа способом масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, идентификационная информация белка содержит идентичность предварительно выбранной подгруппы CAR, включая любые их посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления,

идентификационная информация белка содержит информацию об аминокислотной последовательности CAR, включая любые его посттрансляционные модификации, или один или более его фрагментов.

**[0117]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий качественную информацию, включая присутствие MS иона, пептида и/или белка, включая любые его посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий качественную информацию для рекомбинантного рецептора или одного или более его фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий качественную информацию для трансмембранного белка или одного или более его фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий качественную информацию для белка поверхности клеток или одного или более его фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий качественную информацию для химерного рецептора антигена (CAR), или одного или более его фрагментов.

**[0118]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий количественную информацию (т.е., информацию о распространенности). Широкий круг количественных способов масс-спектрометрии известен в данной области. Количественные способы масс-спектрометрии способны обеспечивать, например, абсолютную количественную оценку (например, посредством мониторинга выбранной реакции), полуколичественную оценку (например, посредством химического мечения) и относительную количественную оценку (например, посредством расчета спектров). В некоторых вариантах осуществления, количественная информация основана на абсолютной количественной оценке. В некоторых вариантах осуществления, количественная информация основана на полуколичественной оценке. В некоторых вариантах осуществления, количественная информация основана на относительной количественной оценке.

**[0119]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий структурную информацию. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий посттрансляционные модификации, включая модификации, возникающие эндогенно и в ходе получения образца.

**[0120]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии дополнительно содержит компонент данных, содержащий теоретическую информацию. В некоторых вариантах осуществления, теоретическая информация основана на известной информации, полученной любым способом, включающим, но без ограничения, способ масс-спектрометрии. Например, эталонный профиль масс-спектрометрии может

содержать теоретическую информацию о MS ионов на основании известной последовательности белка или пептида.

**[0121]** В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящей заявке, предусматривают профиль масс-спектрометрии, содержащий по меньшей мере один компонент данных, где по меньшей мере один компонент данных содержит одну или более точек данных. В некоторых вариантах осуществления, где профиль масс-спектрометрии содержит два или более компонентов данных, два или более компонентов данных могут содержать информацию из любого количества информативных уровней данных, полученных способом масс-спектрометрии, например, идентификационную информацию пептида и количественную информацию для него. Профили масс-спектрометрии, описанные в настоящем описании, не являются ограниченными информацией, полученной посредством одного анализа и/или способа масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий усредненную или объединенную информацию, где усредненная или объединенная информация содержит данные двух или более анализов и/или способов масс-спектрометрии.

**[0122]** В некоторых вариантах осуществления, способы описанные в настоящей заявке, предусматривают получение и/или использование профиля масс-спектрометрии, такого как эталонный профиль масс-спектрометрии или тестируемый профиль масс-спектрометрии, ответственного за изменчивость или дисперсию для одного или более компонентов данных среди множества профилей масс-спектрометрии или анализов масс-спектрометрии, или для одного или более анализированных образцов, таких как множество тестируемых композиций модифицированных клеток. Например, специалисту в данной области хорошо понятно, что два или более анализа масс-спектрометрии одного и того же образца могут приводить к получению данных с некоторой изменчивостью, включая различия в измеренных периодах времени элюции при хроматографии, значениях  $m/z$ , значениях относительной интенсивности или распространенности, и ассоциированных или выведенных измерениях, таких как масса и AUC. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии, такой как эталонный профиль масс-спектрометрии или тестируемый профиль масс-спектрометрии, представляет собой среднее из двух или более анализов масс-спектрометрии. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления, может являться желательной компиляция по меньшей мере части двух или более профилей масс-спектрометрии или данных из двух или более анализов масс-спектрометрии для получения профиля масс-спектрометрии, такого как эталонный профиль масс-спектрометрии, для использования в способах, описанных в настоящем описании. Способы получения профиля масс-спектрометрии, такого как эталонный профиль масс-спектрометрии или тестируемый профиль масс-спектрометрии, из двух или более профилей масс-спектрометрии или данных из двух или более анализов масс-спектрометрии, известны в данной области и включают, например, доступное программное обеспечение для протеомики.

**[0123]** В некоторых вариантах осуществления, значение  $m/z$  для измеренных молекул, таких как пептид или белок, включая их посттрансляционные модификации, является изменчивым между профилями или анализами масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, изменчивость измеренного значения  $m/z$  обусловлена колебаниями измерений, выполненных посредством масс-спектрометра, или среди различных масс-спектрометров.

**[0124]** В некоторых вариантах осуществления, значения относительной интенсивности или распространенности для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии одного и того же образца. В некоторых вариантах осуществления, значения относительной интенсивности или распространенности для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии множества образцов из одной и той же композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, значения относительной интенсивности или распространенности для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии образцов из множества композиций клеток.

**[0125]** В некоторых вариантах осуществления, значения площади под кривой (AUC) для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии одного и того же образца. В некоторых вариантах осуществления, значения AUC для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии множества образцов из одной и той же композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, значения AUC для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии образцов из множества композиций клеток.

**[0126]** В некоторых вариантах осуществления, периоды времени элюции для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии одного и того же образца. В некоторых вариантах осуществления, периоды времени элюции для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии множества образцов из одной и той же композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, периоды времени элюции для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии образцов из множества композиций клеток.

**[0127]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии, такой как эталонный профиль масс-спектрометрии или тестируемый профиль масс-спектрометрии, строят на основании одного или более компонентов данных среди множества профилей или анализов масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, каждый из компонентов данных содержит один или более сигнальных пиков MS ионов.

**[0128]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии, такой как эталонный профиль масс-спектрометрии или тестируемый профиль масс-спектрометрии, представляет собой средний профиль масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, средний профиль масс-спектрометрии содержит среднее значение интенсивности для измеренной молекулы, например, пептида, среди множества профилей или анализов масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, средний профиль масс-спектрометрии содержит среднее значение AUC для измеренной молекулы, например, пептида, среди множества профилей или анализов масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, средний профиль масс-спектрометрии содержит среднее время элюции для измеренной молекулы, например, пептида, среди множества профилей или анализов масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, средний профиль масс-спектрометрии содержит среднее  $m/z$  для измеренной молекулы, например, пептида, среди множества профилей или анализов масс-спектрометрии. Иллюстративные способы определения средних компонентов данных включают, но без ограничения, получение среднего арифметического, медианы, взвешенного среднего или моды присутствия, отсутствия или уровня необработанных, нормализованных или предварительно обработанных компонентов данных.

**[0129]** В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии дополнительно содержит неусредненные значения интенсивности из всех сигнальных пиков MS ионов среди множества профилей масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии дополнительно содержит неусредненные значения AUC из всех сигнальных пиков MS ионов среди множества профилей масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии содержит неусредненные периоды времени элюции из всех сигнальных пиков MS ионов среди множества профилей масс-спектрометрии.

**[0130]** Профили масс-спектрометрии, описанные в настоящем описании, можно получать для широкого круга клеточных образцов, которые, в свою очередь, можно получать для и анализировать посредством способа масс-спектрометрии, любым количеством различных способов. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии содержит компонент данных, содержащий информацию, полученную для образца, содержащего белки, где по меньшей мере две аликвоты образца получают для анализа посредством одного или более способов масс-спектрометрии с использованием по меньшей мере двух различных способов получения образцов. В свете настоящего описания, специалисту в данной области хорошо известен широкий объем того, что может составлять профиль масс-спектрометрии, и то, что описание настоящей заявки не является ограниченным иллюстративными описаниями, представленными в настоящем документе.

**[0131]** Способы, описанные в настоящей заявке, предусматривают профили масс-спектрометрии, полученные, например, для тестируемого образца и эталонного образца. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии представляет собой

тестируемый профиль масс-спектрометрии, где тестируемый профиль масс-спектрометрии представляет собой профиль для образца из тестируемой композиции модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии представляет собой тестируемый профиль масс-спектрометрии, где тестируемый профиль масс-спектрометрии представляет собой профиль для образца из тестируемой композиции модифицированных клеток, где указанная тестируемая композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты, содержащие рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии представляет собой тестируемый профиль масс-спектрометрии, где тестируемый профиль масс-спектрометрии содержит один или более компонентов данных, содержащих информацию для образца из тестируемой композиции модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии представляет собой тестируемый профиль масс-спектрометрии, где тестируемый профиль масс-спектрометрии содержит один или более компонентов данных, содержащих информацию для образца из тестируемой композиции модифицированных клеток, где указанная тестируемая композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты, содержащие рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, тестируемый профиль масс-спектрометрии содержит один или более компонентов данных, содержащих информацию из одного или более анализов масс-спектрометрии, где один или более анализов масс-спектрометрии являются одинаковыми или различными. В некоторых вариантах осуществления, тестируемый профиль масс-спектрометрии содержит один или более компонентов данных, содержащих информацию из одного или более анализов масс-спектрометрии, где один или более анализов масс-спектрометрии представляют собой анализы для образцов, полученных с использованием одного или более различных способов получения образцов. В некоторых вариантах осуществления, тестируемый профиль масс-спектрометрии содержит один или более компонентов данных, содержащих информацию из одного или более анализов масс-спектрометрии, где один или более анализов масс-спектрометрии являются одинаковыми или различными, и где один или более анализов масс-спектрометрии представляют собой анализы для образцов, полученных с использованием одного или более различных способов получения образцов.

**[0132]** В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают определение тестируемого профиля масс-спектрометрии образца из тестируемой композиции модифицированных клеток с использованием способа масс-спектрометрии, где указанная тестируемая композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты, содержащие рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают получение тестируемого профиля масс-спектрометрии образца из тестируемой композиции модифицированных клеток с использованием способа масс-спектрометрии, где указанная

тестируемая композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты, содержащие рекомбинантный рецептор.

**[0133]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии представляет собой эталонный профиль масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии представляет собой эталонный профиль масс-спектрометрии, где эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии представляет собой эталонный профиль масс-спектрометрии, где эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции клеток, где указанная эталонная композиция клеток содержит иммуноциты. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии представляет собой эталонный профиль масс-спектрометрии, где эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции клеток, где указанная эталонная композиция клеток содержит иммуноциты, до трансфекции с использованием рекомбинантного рецептора.

**[0134]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии представляет собой эталонный профиль масс-спектрометрии, где эталонный профиль масс-спектрометрии содержит один или более компонентов данных, содержащих информацию из образца из эталонной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии представляет собой эталонный профиль масс-спектрометрии, где эталонный профиль масс-спектрометрии содержит один или более компонентов данных, содержащих информацию из образца из эталонной композиции клеток, где указанная эталонная композиция клеток содержит иммуноциты. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии представляет собой эталонный профиль масс-спектрометрии, где эталонный профиль масс-спектрометрии содержит один или более компонентов данных, содержащих информацию из образца из эталонной композиции клеток, где указанная эталонная композиция клеток содержит иммуноциты, до трансфекции с использованием рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии содержит один или более компонентов данных, содержащих информацию из одного или более анализов масс-спектрометрии, где один или более анализов масс-спектрометрии являются одинаковыми или различными. В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии содержит один или более компонентов данных, содержащих информацию из одного или более анализов масс-спектрометрии, где один или более анализов масс-спектрометрии получены для образцов, полученных с использованием одного или более различных способов получения образцов. В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии содержит один или более компонентов данных, содержащих информацию из одного или более анализов масс-спектрометрии, где один или более анализов масс-спектрометрии являются одинаковыми или различными, и где один или более анализов масс-спектрометрии получены для

образцов, полученных с использованием одного или более различных способов получения образцов.

**[0135]** В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают определение эталонного профиля масс-спектрометрии образца из эталонной композиции модифицированных клеток с использованием способа масс-спектрометрии, где указанная эталонная композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают получение эталонного профиля масс-спектрометрии образца из эталонной композиции модифицированных клеток с использованием способа масс-спектрометрии, где указанная эталонная композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты.

**[0136]** В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают определение эталонного профиля масс-спектрометрии образца из эталонной композиции модифицированных клеток с использованием способа масс-спектрометрии, где указанная эталонная композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты, содержащие рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают получение эталонного профиля масс-спектрометрии образца из эталонной композиции модифицированных клеток с использованием способа масс-спектрометрии, в котором эталонная композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты или является обогащенной иммуноцитами, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, или в котором такие иммуноциты содержат гетерологичный полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор.

## **В. Сравнение профилей масс-спектрометрии**

**[0137]** В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают сравнение профилей масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают сравнение одного или более тестируемых профилей масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают сравнение одного или более эталонных профилей масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают сравнение тестируемого профиля масс-спектрометрии с эталонным профилем масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают сравнение одного или более тестируемых профилей масс-спектрометрии с одним или более эталонными профилями масс-спектрометрии.

**[0138]** В некоторых вариантах осуществления, представленные способы сравнения профилей масс-спектрометрии между композициями клеток можно использовать для выяснения признаков или свойств композиции модифицированных клеток, включая признаки и свойства рекомбинантного рецептора, или его части или компонента, которые могут являться связанными или ассоциированными с конкретным способом получения

композиции модифицированных клеток, эффектом конкретных условий инкубации или культивирования, включая присутствие или отсутствие конкретных реагентов, изменения или преобразования композиции модифицированных клеток при стимуляции, модификации (например, трансдукции) или зависимой от рекомбинантного рецептора активации, например, при воздействии антигена или антиидиотипического антитела. В некоторых аспектах, такие способы можно использовать для идентификации функциональных клеточных рычагов, которые могут обеспечивать информацией или облегчать способы получения композиций модифицированных клеток. В некоторых аспектах, представленные способы являются более мощными и/или обеспечивают ортогональную информацию по сравнению с существующими способами оценки, характеризующей белки клеток, такими как способы анализа на основе проточной цитометрии и транскриптома. Например, способы на основе масс-спектрометрии, описанные в настоящем описании, способны обеспечивать возможность одновременного получения профиля клеточного образца несмещенным образом (например, без предшествующей гипотезы о мишени), по меньшей мере для следующего: экспрессия пептида и белка, информация секвенирования, количественная оценка, клеточная локализация (например, посредством выбранного способа получения образца, такого как выделение белков поверхности клетки) и посттрансляционные модификации.

**[0139]** Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, полезность способов, описанных в настоящем описании, может быть основана на первом профиле масс-спектрометрии и втором профиле масс-спектрометрии, таких как тестируемый профиль масс-спектрометрии и эталонный профиль масс-спектрометрии, способных обеспечивать значимое с научной точки зрения сравнение, например, различие в присутствии и/или распространенности белка или пептида. В некоторых вариантах осуществления, получение профилей масс-спектрометрии может, таким образом, требовать дизайна и/или выбора способов получения образцов и/или способов масс-спектрометрии таким образом, что первый профиль масс-спектрометрии первого образца и второй профиль масс-спектрометрии второго образца могут содержать перекрывающиеся компоненты данных, частично или полностью, которые можно приписать одному белку и/или пептиду, если один белок и/или пептид присутствует в первом образце и втором образце. Например, в некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают анализ первого образца из первой клеточной композиции и второго образца из второй клеточной композиции с использованием таких же или сходных способов получения образцов и таких же или сходных способов масс-спектрометрии для получения первого профиля масс-спектрометрии первого образца и второго профиля масс-спектрометрии второго образца, таким образом, обеспечение возможности сравнения первого профиля масс-спектрометрии и второго профиля масс-спектрометрии.

**[0140]** В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают идентификацию одного или более различий в присутствии,

отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в тестируемом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с эталонным профилем масс-спектрометрии, таким образом, идентификацию профиля масс-спектрометрии композиции клеток, содержащий рекомбинантный рецептор. Как описано на протяжении этой заявки, по меньшей мере один компонент данных, содержащийся в профиле масс-спектрометрии, включает любой одиночный информативный фрагмент данных или любую комбинацию информативных данных, полученные из одного анализа или серий анализов масс-спектрометрии, включая любой фрагмент данных из любого последующего анализа полученных данных сигнала MS и полученную из него информацию. Таким образом, например, одно или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в профиле масс-спектрометрии может включать различия в: информации о MS ионов, общей ионной хроматограмме (TIC) или ее части, экстракционной ионной хроматограмме (XIC) или ее части, сигнальном пике ионов при пептидной MS, сигнальном пике ионов при белковой MS, идентификационной информации пептида, такие как различия в пептидных последовательностях, идентификационной информации белка, качественной информации, количественной информации, структурной информации и посттрансляционных модификациях.

**[0141]** В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящей заявке, предусматривают расчет величины изменчивости или дисперсии для одного или более компонентов данных среди множества профилей масс-спектрометрии или анализов масс-спектрометрии, или для одного или более анализируемых образцов, например, для множества тестируемых композиций модифицированных клеток. Например, специалисту в данной области хорошо понятно, что два или более анализа масс-спектрометрии одного и того же образца могут приводить к получению данных с некоторой изменчивостью, включая различия в измеренных периодах времени элюции при хроматографии, значениях  $m/z$ , значениях относительной интенсивности или распространенности, и ассоциированных или выведенных измерениях, таких как масса и AUC.

**[0142]** В некоторых вариантах осуществления, значение  $m/z$  для измеренных молекул, таких как пептид или белок, включая их посттрансляционные модификации, является изменчивым между профилями или анализами масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, изменчивость измеренного значения  $m/z$  обусловлена колебаниями измерений, выполненных посредством масс-спектрометра, или среди различных масс-спектрометров. В некоторых вариантах осуществления, рассчитывают величину изменчивости или дисперсии измеренных значений  $m/z$  для измеренной молекулы, например, пептида.

**[0143]** В некоторых вариантах осуществления, значения относительной интенсивности или распространенности для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии одного и того же образца. В некоторых вариантах осуществления, значения относительной интенсивности или распространенности для измеренной молекулы, например, пептида,

являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии множества образцов из одной и той же композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, значения относительной интенсивности или распространенности для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии образцов из множества композиций клеток. В некоторых вариантах осуществления, рассчитывают величину изменчивости или дисперсию значений относительной интенсивности или распространенности для измеренной молекулы, например, пептида.

**[0144]** В некоторых вариантах осуществления, значения площади под кривой (AUC) для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии одного и того же образца. В некоторых вариантах осуществления, значения AUC для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии множества образцов из одной и той же композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, значения AUC для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии образцов из множества композиций клеток. В некоторых вариантах осуществления, рассчитывают величину изменчивости или дисперсии значений AUC для измеренной молекулы, например, пептида.

**[0145]** В некоторых вариантах осуществления, периоды времени элюции для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии одного и того же образца. В некоторых вариантах осуществления, периоды времени элюции для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии множества образцов из одной и той же композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, периоды времени элюции для измеренной молекулы, например, пептида, являются изменчивыми между профилями или анализами масс-спектрометрии образцов из множества композиций клеток. В некоторых вариантах осуществления, рассчитывают величину изменчивости или дисперсии периодов времени элюции для измеренной молекулы, например, пептида.

**[0146]** Иллюстративные способы определения величины изменчивости среди компонентов данных включают, но без ограничения, получение стандартного отклонения, диапазона или межквартильного диапазона уровня необработанных, нормализованных или предварительно обработанных компонентов данных, или получение вероятности или доли присутствия или отсутствия одного или более необработанных, нормализованных или предварительно обработанных компонентов данных.

### **С. Способы масс-спектрометрии**

**[0147]** По настоящему изобретению предусмотрен широкий круг способов масс-спектрометрии, пригодных для использования со способами и стадиями способов, описанных в настоящем описании, включая определение профиля масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании,

включают анализ образца из тестируемой композиции модифицированных клеток с использованием одного или более способов масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают анализ образца из эталонной композиции клеток с использованием одного или более способов масс-спектрометрии. Как обсуждают в настоящем описании, в некоторых вариантах осуществления, способами масс-спектрометрии можно собирать данные для получения огромного количества информации об образце, включая компоненты данных из любой комбинации информации о MS ионов, информации об идентификации/последовательности пептида и/или белка, информации о посттрансляционной модификации и информации о количественной оценке. В свою очередь, компонент данных или их множество, полученные способом масс-спектрометрии, используют, например, для получения профиля масс-спектрометрии. Следующие способы масс-спектрометрии, проиллюстрированные в предшествующем разделе, так же как на протяжении этой заявки, представляют собой иллюстративные способы для способов масс-спектрометрии, которые можно использовать для получения профиля масс-спектрометрии. Однако, способы, описанные в настоящем описании, не ограничены способами масс-спектрометрии, описанными в настоящем описании. В свете раскрытия в настоящем описании, специалисту в данной области понятен круг способов масс-спектрометрии, которые можно использовать для способов, описанных в настоящем описании.

**[0148]** В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ жидкостной хроматографии.

**[0149]** По настоящему изобретению предусмотрен широкий круг способов жидкостной хроматографии, пригодных для способов, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ жидкостной хроматографии, пригодный для применения в протеомике. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ жидкостной хроматографии, пригодный для разделения пептидов. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает разделение пептидов способом жидкостной хроматографии.

**[0150]** Способы жидкостной хроматографии, предусмотренные по настоящему изобретению, включают способы разделения пептидов и способы жидкостной хроматографии, совместимые со способами масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, способ жидкостной хроматографии включает способ высокоэффективной жидкостной хроматографии. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, способ жидкостной хроматографии включает способ сверхвысокоэффективной

жидкостной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, способ жидкостной хроматографии включает способ высокопроточной жидкостной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, способ жидкостной хроматографии включает способ низкопроточной жидкостной хроматографии, такой как способ микропроточной жидкостной хроматографии или способ нанопроточной жидкостной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, способ жидкостной хроматографии включает способ поточной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометром. В некоторых вариантах осуществления, способ поточной жидкостной хроматографии представляет собой способ высокоэффективной жидкостной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, способ поточной жидкостной хроматографии представляет собой способ сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии.

**[0151]** Способы жидкостной хроматографии, предусмотренные по настоящему изобретению, включают использование жидкостного хроматографа. В некоторых вариантах осуществления, жидкостной хроматограф включает высокоэффективный жидкостной хроматограф. В некоторых вариантах осуществления, жидкостной хроматограф включает сверхвысокоэффективный жидкостной хроматограф. В некоторых вариантах осуществления, жидкостной хроматограф включает высокопроточный жидкостной хроматограф. В некоторых вариантах осуществления, жидкостной хроматограф включает низкопроточный жидкостной хроматограф, такой как микропроточный жидкостной хроматограф или нанопроточный жидкостной хроматограф. В некоторых вариантах осуществления, жидкостной хроматограф содержит поточный жидкостной хроматограф в сочетании с масс-спектрометром. В некоторых вариантах осуществления, жидкостной хроматограф включает поточный высокоэффективный жидкостной хроматограф, где поточный высокоэффективный жидкостной хроматограф представлен в сочетании с масс-спектрометром. В некоторых вариантах осуществления, жидкостной хроматограф включает поточный сверхвысокоэффективный жидкостной хроматограф, где поточный сверхвысокоэффективный жидкостной хроматограф представлен в сочетании с масс-спектрометром.

**[0152]** Способы жидкостной хроматографии и жидкостные хроматографы, предусмотренные для использования со способами, описанными в настоящей заявке, являются пригодными для разделения образцов, содержащих смесь белков и/или смесь пептидов, перед введением указанного образца в масс-спектрометр, с использованием хроматографической колонки. В некоторых вариантах осуществления, способ жидкостной хроматографии включает способ обращеннофазовой жидкостной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, способ жидкостной хроматографии включает способ нормальнофазовой жидкостной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, способ жидкостной хроматографии включает способ эксклюзионной жидкостной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, способ жидкостной хроматографии включает способ высокоэффективной анионообменной хроматографии. В

некоторых вариантах осуществления, способ жидкостной хроматографии включает способ хроматографии гидрофильного взаимодействия.

**[0153]** В некоторых вариантах осуществления, способ жидкостной хроматографии включает способ капиллярного электрофореза (CE).

**[0154]** В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает технологию автодозатора. В некоторых вариантах осуществления, жидкостной хроматограф соединен с автодозатором.

**[0155]** В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ ионизации. Способы ионизации, предусмотренные по настоящему изобретению, включают способы, которыми можно заряжать белки и пептиды для анализа посредством масс-спектрометра. В некоторых вариантах осуществления, способ ионизации представляет собой ионизацию электрораспылением (ESI). В некоторых вариантах осуществления, способ ионизации представляет собой ионизацию нанoeлектрораспылением (nESI). В некоторых вариантах осуществления, способ ионизации представляет собой химическую ионизацию при атмосферном давлении. В некоторых вариантах осуществления, способ ионизации представляет собой фотоионизацию при атмосферном давлении. В некоторых вариантах осуществления, способ ионизации представляет собой ионизацию лазерной десорбцией с использованием матрицы (MALDI). В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ ионизации электрораспылением, ионизации нанoeлектрораспылением или ионизации лазерной десорбцией с использованием матрицы (MALDI).

**[0156]** Способы масс-спектрометрии, описанные в настоящем описании, включают анализ образца, содержащего смесь белков и/или смесь пептидов, с использованием системы масс-спектрометра. Системы масс-спектрометров, предусмотренные для использования со способами, описанными в настоящем описании, включают масс-спектрометры высокого разрешения, масс-спектрометры низкого разрешения и гибриды из любой их комбинации, и ассоциированные с ними способы. В некоторых вариантах осуществления, система масс-спектрометра содержит ионную ловушку. В некоторых вариантах осуществления, система масс-спектрометра содержит квадрупольную ионную ловушку. В некоторых вариантах осуществления, система масс-спектрометра содержит масс-спектрометр orbitrap. В некоторых вариантах осуществления, система масс-спектрометра содержит квадрупольный масс-спектрометр orbitrap. В некоторых вариантах осуществления, система масс-спектрометра содержит времяпролетный (TOF) масс-спектрометр. В некоторых вариантах осуществления, система масс-спектрометра содержит квадрупольный-времяпролетный (Q-TOF) масс-спектрометр. В некоторых вариантах осуществления, система масс-спектрометра содержит имеющий квадрупольную ионную ловушку времяпролетный (QIT-TOF) масс-спектрометр. В некоторых вариантах осуществления, система масс-спектрометра содержит тройной квадрупольный (QQQ) масс-спектрометр. В некоторых вариантах осуществления, система масс-спектрометра содержит использующий ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье (FT)

масс-спектрометр. В некоторых вариантах осуществления, система масс-спектрометра содержит квадрупольный использующий ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье (Q-FT) масс-спектрометр.

**[0157]** В некоторых вариантах осуществления, система масс-спектрометра представлена в сочетании с жидкостным хроматографом, таким как поточный жидкостной хроматограф. В некоторых вариантах осуществления, система масс-спектрометра представлена в сочетании с жидкостным хроматографом и автодозатором.

**[0158]** В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает режим детекции положительно заряженных ионов. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает режим детекции отрицательно заряженных ионов. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ времяпролетной (TOF) масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ квадрупольной времяпролетной (Q-TOF) масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ масс-спектрометрии на основе подвижности ионов. В некоторых вариантах осуществления способ масс-спектрометрии низкого разрешения, такой как способ ионной ловушки, или одинарный или тройной квадрупольный способ, является пригодным.

**[0159]** В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает получение данных  $MS^1$  с разрешением сканирования 120000. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает получение данных  $MS^1$  с диапазоном сканирования от приблизительно 100  $m/z$  до приблизительно 2000  $m/z$ , например, от приблизительно 325  $m/z$  до приблизительно 2000  $m/z$ . В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает получение данных  $MS^2$  с разрешением сканирования 30000. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает получение данных  $MS^2$  с диапазоном сканирования от приблизительно 100  $m/z$  до приблизительно 2000  $m/z$ , например, от приблизительно 200  $m/z$  до приблизительно 2000  $m/z$ .

**[0160]** В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ тандемной масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ зависимо от данных сбора. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ независимо от данных сбора. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает способ направленного сбора данных масс-спектрометрии, включая мониторинг избранного иона (SIM), мониторинг избранной реакции (SRM) и мониторинг множественных реакций (MRM).

**[0161]** В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии представляет собой количественный способ масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, количественный способ масс-спектрометрии представляет собой способ абсолютной количественной оценки, такой как SRM или MRM. В некоторых вариантах

осуществления, количественный способ масс-спектрометрии представляет собой полуколичественный способ, такой как способ количественной оценки на основе метки. В некоторых вариантах осуществления, количественный способ масс-спектрометрии представляет собой способ относительной количественной оценки, такой как расчет спектров. В некоторых вариантах осуществления, количественный способ масс-спектрометрии представляет собой способ количественной оценки на основе метки. В некоторых вариантах осуществления, количественный способ масс-спектрометрии представляет собой способ количественной оценки без использования метки.

**[0162]** В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, дополнительно включают обработку данных, полученных способом масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает обработку полученных сигналов MS ионов пептида или белка. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает детекцию пика. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает определение интенсивности ионизации иона пептида. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает определение высоты пика иона пептида. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает определение площади пика сигнала MS иона пептида. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает определение объема пика пептида и/или белка. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает количественную оценку иона пептида и/или иона белка. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает количественную оценку пептида и/или белка. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает идентификацию последовательности пептида и/или белка, например, посредством программного обеспечения для протеомики. В некоторых вариантах осуществления, программное обеспечение для протеомики идентифицирует пептидную и/или белковую последовательность с использованием известных баз данных последовательностей генов или белков организма, таких как база данных белков человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления, программное обеспечение для протеомики идентифицирует пептидную и/или белковую последовательность *de novo*. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает подтверждение вручную идентификации пептида и/или белка. В некоторых вариантах осуществления, способ масс-спектрометрии включает идентификацию пептида и/или белка посредством спектральной библиотеки. Как правило, использование спектральных библиотек позволяет подстановку информации, собранной, применительно к пептидной и/или белковой системе, и приводит к увеличенной скорости анализа данных с уменьшением ошибки.

#### **D. Способы получения образцов**

**[0163]** В некоторых аспектах по настоящему описанию, способы, описанные в настоящем описании, включают осуществление способа получения образца. Как правило, клеточные образцы могут нуждаться в переработке для совместимости со способом масс-

спектрометрии, включая выделение белка/пептида, удаление детергентов, концентрирование/пулирование образцов на любой стадии и/или протеолитическое расщепление. В некоторых вариантах осуществления, способ получения образца включает способ выделения полипептида. В некоторых вариантах осуществления, способом выделения полипептида выделяют подгруппу клеточного протеома, например, белки поверхности клеток, из других клеточных компонентов. В некоторых вариантах осуществления, способом выделения полипептида выделяют клеточный протеом, например, для полного анализа клеточного протеома, из других клеточных компонентов. В некоторых вариантах осуществления, способа получения образца содержит способ переработки полипептида. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, способы включают получение образца, совместимое со способом масс-спектрометрии.

### **1. Способы выделения полипептидов**

**[0164]** В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, обеспечивают способ выделения полипептида, где способ выделения полипептида является пригодным для выделения подгруппы клеточного протеома из других клеточных компонентов. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают способ выделения полипептида, где посредством осуществления способа выделения полипептида выделяют рекомбинантный рецептор из других клеточных компонентов. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают способ выделения полипептида, где посредством осуществления способа выделения полипептида выделяют трансмембранный белок из других клеточных компонентов. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают способ выделения полипептида, где посредством осуществления способа выделения полипептида выделяют белок поверхности клеток из других клеточных компонентов. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают способ выделения полипептида, где посредством осуществления способа выделения полипептида выделяют химерный рецептор антигена (CAR) из других клеточных компонентов.

**[0165]** В некоторых вариантах осуществления, способ выделения полипептида включает: (a) мечение одного или более белков, присутствующих в образце из образца композиции клеток, таким образом, получение образца композиции меченых клеток; (b) лизиса клеток из образца композиции меченых клеток, таким образом, получение образца композиции лизированных клеток; и (c) выделение одного или более белков из композиции лизированных клеток для получения одного или более выделенных белков. В некоторых вариантах осуществления, способ выделения полипептида включает: (a) мечение одного или более белков поверхности клеток, присутствующих на клетках из образца композиции модифицированных клеток, где клетки из образца композиции модифицированных клеток содержат рекомбинантный рецептор, таким образом, получение образца композиции меченых клеток; (b) лизис клеток из образца композиции

меченых клеток, таким образом, получение образца композиции лизированных клеток; и (с) выделение одного или более белков поверхности клеток из образца композиции лизированных клеток для получения одного или более выделенных белков.

**[0166]** В некоторых вариантах осуществления, лизис клеток включает инкубацию в присутствии детергента. В некоторых вариантах осуществления, детергент представляет собой неионный детергент, анионный детергент, катионный детергент или цвиттер-ионный детергент. Иллюстративные детергенты включают, но без ограничения, мальтозиды, тиомальтозиды, алкилгликозиды и гликоли. Иллюстративные детергенты включают, но без ограничения, *n*-децил- $\beta$ -D-мальтозид, *n*-додецил- $\beta$ -D-мальтозид, *n*-ундецил- $\beta$ -D-мальтозид, Cymal-5, Cymal-6, *n*-додецил- $\beta$ -D-тиомальтопиранозид, октилглюкозу, неопентилгликоль, полиоксиэтилен, Triton X-100, Triton X-114, C8E4, C8E5, C12E8, анарое-35 (Brij-35), анарое-58 (Brij-58), N-40, Tween 20, Tween 80, бромид этилтриметиламмония, октилглюкозид и октилтиоглюкозид.

**[0167]** В некоторых вариантах осуществления, лизис клеток включает инкубацию в присутствии неионного детергента, анионного детергента, катионного детергента, цвиттер-ионного детергента или любой комбинации двух или более детергентов из них.

**[0168]** В некоторых вариантах осуществления, лизис клеток включает инкубацию в присутствии денатурирующего детергента. В некоторых вариантах осуществления, денатурирующий детергент представляет собой анионный детергент или катионный детергент. Иллюстративные денатурирующие детергенты включают, но без ограничения, додецилсульфат натрия и бромид этилтриметиламмония. В некоторых вариантах осуществления, денатурирующий детергент представляет собой или содержит додецилсульфат натрия (SDS).

**[0169]** В некоторых вариантах осуществления, лизис клеток включает инкубацию в присутствии неденатурирующего детергента. В некоторых вариантах осуществления, неденатурирующий детергент представляет собой неионный детергент или цвиттер-ионный детергент. Иллюстративные неденатурирующие детергенты включают, но без ограничения, Triton X-100, соли желчных кислот, такие как холат и CHAPS.

**[0170]** В некоторых вариантах осуществления, детергент представляет собой совместимый с масс-спектрометрией детергент.

**[0171]** В некоторых вариантах осуществления, лизис клеток включает инкубацию в присутствии детергента, где концентрация детергента составляет от приблизительно 0,1% до приблизительно 5%, например, составляет любое из от приблизительно 0,1% до приблизительно 4,5%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 4%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 3%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 2,5%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 2%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,5%, от приблизительно 0,8% до приблизительно 1,2%, или от приблизительно 0,9% до приблизительно 1,1%. В некоторых вариантах осуществления, лизис клеток включает инкубацию в присутствии детергента, где концентрация детергента составляет менее, чем приблизительно 5%, например, менее, чем приблизительно любое из 4,5%, 4%, 3,5%, 3%,

2,5%, 2%, 1,5%, 1%, или 0,5%. В некоторых вариантах осуществления, лизис клеток включает инкубацию в присутствии детергента, где концентрация детергента составляет более, чем приблизительно 0,5%, например, более, чем приблизительно любое из 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% или 4,5%. В некоторых вариантах осуществления, лизис клеток включает инкубацию в присутствии детергента, где концентрация детергента составляет приблизительно 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% или 5%.

**[0172]** В некоторых вариантах осуществления, мечение поверхностных белков включает мечение с использованием аффинного средства или аффинного манипулятора. В некоторых вариантах осуществления, мечение поверхностных белков включает мечение с использованием аффинного средства или аффинного манипулятора, где аффинное средство или аффинный манипулятор является не проникающим в клетку. В некоторых вариантах осуществления, мечение поверхностных белков включает биотиновое мечение. В некоторых вариантах осуществления, мечение поверхностных белков включает биотиновое мечение первичных аминов. В некоторых вариантах осуществления, мечение поверхностных белков включает мечение с использованием реагента для клик-химии.

**[0173]** В некоторых вариантах осуществления, один или более белков выделяют с использованием реагента, содержащего авидин, стрептавидин, NeutrAvidin™ или CaptAvidin™. В некоторых вариантах осуществления, один или более белков выделяют с использованием реагента, содержащего комплементарный реагент для клик-химии.

**[0174]** В некоторых вариантах осуществления, способом выделения полипептида выделяют клеточный протеом, например, для полного анализа клеточного протеома, из других клеточных компонентов.

**[0175]** В некоторых вариантах осуществления, способ выделения полипептида дополнительно включает стадию очистки полипептида, включающую удаление вещества, несовместимого со способом масс-спектрометрии, например, поверхностно-активного вещества или детергента, из образца.

## **2. Способы переработки полипептидов**

**[0176]** В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящем описании, включают осуществление способа переработки полипептида. Как правило, после способа выделения полипептида, образцы полипептидов могут нуждаться в переработке для совместимости со способом масс-спектрометрии, включая модификацию растворителя, протеолитическое расщепление и/или концентрирование. Такие способы выделения полипептидов хорошо известны в данной области и предусмотрены для использования со способами по настоящему описанию. Настоящее изобретение относится к иллюстративным способам переработки полипептидов, которыми способы по настоящему описанию не должны быть ограничены.

**[0177]** В некоторых вариантах осуществления, способ переработки полипептида представляет собой способ переработки цельного белка. В некоторых вариантах осуществления, способ переработки цельного белка включает модификацию или доведение растворителя из образца полипептида. В некоторых вариантах осуществления,

способ переработки цельного белка включает концентрирование образца полипептида. В некоторых вариантах осуществления, способ переработки цельного белка включает денатурацию белка в образце полипептида. В некоторых вариантах осуществления, способ переработки цельного белка включает очистку белка в образце полипептида. В некоторых вариантах осуществления, модификацию или доведение растворителя из образца полипептида, например, добавление к образцу полипептида кислоты, такой как трифторуксусная кислота или муравьиная кислота.

**[0178]** В некоторых вариантах осуществления, способ переработки полипептида представляет собой способ переработки полипептида на основе расщепления. В некоторых вариантах осуществления, способ переработки полипептида на основе расщепления включает денатурацию белка в образце полипептида. В некоторых вариантах осуществления, способ переработки полипептида на основе расщепления содержит модификацию или доведение растворителя из образца полипептида. В некоторых вариантах осуществления, способ переработки полипептида на основе расщепления содержит добавление восстанавливающего средства и/или модифицирующего аминокислоты средства, такого как иодацетамид, к образцу полипептида. В некоторых вариантах осуществления, способ переработки полипептида на основе расщепления включает способ расщепления полипептида, например, посредством протеолитического и/или химического расщепления. В некоторых вариантах осуществления, способ расщепления полипептида включает ферментное расщепление с использованием протеазы. В некоторых вариантах осуществления, протеаза представляет собой одно или более из трипсина, Lys-C, IdeS, IdeZ, PNGазы F, термолизина, пепсина, эластазы, Arg-C, TEV, Glu-C, Asp-N и фактора Ха. В некоторых вариантах осуществления, расщепление образца включает химическое расщепление, такое как кислотный гидролиз. В некоторых вариантах осуществления, способ переработки полипептида на основе расщепления включает обессоливание образца полипептида. В некоторых вариантах осуществления, способ переработки полипептида на основе расщепления включает концентрирование образца полипептида. В некоторых вариантах осуществления, способ переработки полипептида на основе расщепления включает очистку пептида в образце полипептида. В некоторых вариантах осуществления, модификацию или доведение растворителя из образца полипептида, например, добавление к образцу полипептида кислоты, такой как трифторуксусная кислота или муравьиная кислота.

**[0179]** В некоторых вариантах осуществления, образец полипептида разделяют первую аликвоту и вторую аликвоту, где первую аликвоту перерабатывают с использованием первого способа переработки полипептида, где вторую аликвоту перерабатывают с использованием второго способа переработки полипептида, и где первый способ переработки полипептида и второй способ переработки полипептида являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления, образец полипептида разделяют на первую аликвоту и вторую аликвоту, где первую аликвоту перерабатывают с использованием первого способа переработки полипептида, где вторую аликвоту

перерабатывают с использованием второго способа переработки полипептида, и где первый способ переработки полипептида и второй способ переработки полипептида являются различными.

#### **Е. Измерение гликанов**

**[0180]** В конкретных вариантах осуществления, изменения или различия в экспрессии ферментов, например, гликотрансфераз, можно оценивать, анализировать или определять посредством детекции присутствия N-гликанов на поверхности клеток. В некоторых аспектах, гликаны присоединяют к белкам посредством посттрансляционной модификации, например, чтобы получать гликопротеины или протеогликаны. Как правило, гликаны обнаруживают на внешней поверхности клеток, например, конъюгированными с поверхностными белками. В некоторых аспектах, гликан содержит олигосахарид или большое количество моносахаридов, соединенных гликозидными связями.

**[0181]** Конкретные варианты осуществления предусматривают, что, поскольку специфические виды гликанов конъюгируют с белками посредством специфических ферментов, например, специфических гликотрансфераз, детекция присутствия, отсутствия, уровня или количества одного или более специфических гликанов указывает на присутствие, отсутствие, уровень, количество, или активность специфических ферментов, например, специфических гликотрансфераз, с соответствующей активностью, например, конъюгации специфического гликана с белками в качестве посттрансляционной модификации. В некоторых вариантах осуществления, посттрансляционная модификация белков посредством добавления специфических гликанов опосредована специфическими гликотрансферазами. Такие гликотрансферазы включают, но без ограничения, гликотрансферазы, кодированные генами MGAT1, MGAT2, MGAT3, MGAT4A, MGAT4B, MGAT5 и MGAT5B. В некоторых вариантах осуществления, присутствие, отсутствие, уровень или количество гликанов, например, N-гликанов, присутствующих на поверхности клеток, детектируют или измеряют как считывание присутствия, отсутствия, уровня или количества одной или более гликотрансфераз. В конкретных вариантах осуществления, присутствие, отсутствие, уровень или количество гликанов, например, N-гликанов, присутствующих на поверхности клеток, детектируют или измеряют как считывание присутствия, отсутствия, уровня или количества одной или более гликотрансфераз, кодируемых посредством MGAT1, MGAT2, MGAT3, MGAT4A, MGAT4B, MGAT5 или MGAT5B.

**[0182]** В конкретных вариантах осуществления, детекцию гликанов можно проводить посредством способа, способного к идентификации и/или количественной оценке количеств индивидуальных видов гликанов. В конкретных вариантах осуществления, виды гликанов включает гликаны, которые имеют идентичные структуры, которые являются отличными от структур других видов гликанов. В конкретных вариантах осуществления, способ представляет собой способ масс-спектрометрии и/или способ жидкостной хроматографии (LC), такой как высокоэффективная жидкостная

хроматография (HPLC) или сверхпроизводительная жидкостная хроматография (UPLC). В некоторых вариантах осуществления, гликаны детектируют с использованием любого пригодного способа, представленного в настоящем описании, например, в разделе I.

**[0183]** В конкретных вариантах осуществления, композицию клеток инкубируют, культивируют или обрабатывают в условиях, подходящих для удаления, высвобождения или открепления гликанов, например, N-гликанов, от поверхности клеток из композиции. В конкретных вариантах осуществления, композицию клеток обрабатывают, инкубируют и/или приводят в контакт со средством для удаления, отделения или открепления гликанов, например, N-гликанов, от поверхности клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки являются интактными, т.е., клетки не лизируют или не гомогенизируют до обработки средством. В конкретных вариантах осуществления, клетки представляют собой живые клетки. В некоторых вариантах осуществления, обработка, инкубация и/или контакт клеток со средством не разрушает и/или не разрывает мембрану клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой живые клетки, и обработка, инкубация или контакт клеток со средством не уничтожает клетки. В конкретных вариантах осуществления, клетки представляют собой живые клетки, и обработка, инкубация или контакт клеток со средством не индуцирует гибель клеток, например, апоптоз или некроз в клетках.

**[0184]** В некоторых вариантах осуществления, композицию клеток обрабатывают, инкубируют и/или приводят в контакт со средством, таким как N-гликозидаза, например, PNGаза F, что приводит к удалению, отделению и/или откреплению гликанов, например, N-гликанов, от экспонированного на поверхности гликоконъюгата. В некоторых вариантах осуществления, гликоконъюгат представляет собой белок, например, гликопротеин. В конкретных вариантах осуществления, обработка, контакт и/или инкубация композиции клеток со средством приводит к удалению, отделению и/или откреплению гликанов от экспонированного на поверхности белка. В конкретных вариантах осуществления, высвобожденные, удаленные и/или открепленные N-гликаны являются интактными. В некоторых вариантах осуществления, удаление, отделение и/или открепление гликанов от экспонированного на поверхности белка не разрушает, не расщепляет и/или не изменяет иным образом структуру гликана. В конкретных вариантах осуществления, удаление, отделение и/или открепление гликанов от экспонированного на поверхности белка не разрушает, не расщепляет и/или не изменяет иным образом структуру группы, например, белка, из которого гликан был высвобожден. В некоторых вариантах осуществления, удаление, отделение и/или открепление гликанов от экспонированного на поверхности белка приводит к переводу аспарагина в аспарат, но иным образом не разрушает, не расщепляет и/или не изменяет структуру белка, из которого гликан был высвобожден.

**[0185]** В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой любое средство, способствующее удалению, отделению и/или откреплению гликанов, например, N-гликанов, от гликоконъюгата, например, гликопротеина. В конкретных вариантах

осуществления, средство химически удаляет гликан от гликоконъюгата, например, но без ограничения, гидразинолизом или щелочной  $\beta$ -элиминацией.

**[0186]** В конкретных вариантах осуществления, средство представляет собой фермент. В конкретных вариантах осуществления, средство представляет собой фермент, который специфически удаляет, отделяет и/или открепляет N- или O-связанные гликаны от гликоконъюгата. В конкретных вариантах осуществления, средство представляет собой амидазу. В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой или включает гликозидазу, такую как N-гликозидаза. В конкретных вариантах осуществления, средство представляет собой или включает эндогликозидазу H (Endo H), эндогликозидазу F (EndoF), N-гликозидазу A (PNGазу A) или N-гликозидазу F (PNGазу F), или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой или включает амидазу из класса пептид-N4-(N-ацетил-бета-глюкозаминил)аспарагинамидазы. В конкретных вариантах осуществления, средство представляет собой или включает PNGазу F.

**[0187]** В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой фермент, который высвобождает или является способным высвободить полноразмерные олигосахариды из белков и пептидов, имеющих N-связанные углеводы. В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой PNGазу F, которая высвобождает или является способным высвободить полноразмерные олигосахариды из белков и пептидов, имеющих N-связанные углеводы. В конкретных вариантах осуществления, средство не представляет собой или не включает эндогликозидазы, такие как Endo F, Endo H и Endo D. В некоторых вариантах осуществления, эндогликозидазы, такие как Endo F, Endo H и Endo D, не высвобождают полноразмерные олигосахариды и/или не отщепляют все известные общие классы N-связанных олигосахаридов из гликопротеинов.

**[0188]** В конкретных вариантах осуществления, средство не представляет собой протеазу. В некоторых вариантах осуществления, средство не включает протеазу. В конкретных вариантах осуществления, средство не представляет собой сериновую протеазу, цистеиновую протеазу, треониновую протеазу, аспарагиновую протеиназу, глутаминовую протеазу, металлопротеиназу или аспарагин-пептид-лиазы. В конкретных вариантах осуществления, средство не представляет собой и не включает эндопептидазу, например, трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин и эластазу. В конкретных вариантах осуществления, средство не представляет собой и не включает трипсин.

**[0189]** В конкретных вариантах осуществления, инкубация в условиях, являющихся пригодными для удаления, высвобождения или открепления гликанов от поверхности клеток, включает приведение в контакт, обработку и/или инкубацию клеток со средством. В конкретных вариантах осуществления, средство представляет собой или включает PNGазу F. PNGазу F представляет собой амидазу класса пептид-N4-(N-ацетил-бета-глюкозаминил)аспарагинамидазы. В некоторых вариантах осуществления, PNGазу F представляет собой бактериальный фермент, который высвобождает N-гликаны с аспарагина. В конкретных вариантах осуществления, PNGазу F высвобождает

полноразмерный, т.е., интактный, N-гликан с аспарагина. В конкретных вариантах осуществления, PNGаза F удаляет олигоманнозные, гибридные и комплексные N-гликаны, прикрепленные к аспарагину. В конкретных вариантах осуществления, PNGаза F высвобождает N-гликаны, прикрепленные к азоту аспарагина, таким образом, переводя аспарагин в аспарат. В конкретных вариантах осуществления, расщепление происходит в положении углевода, соседнем с остатком аспарагина. В конкретных вариантах осуществления, средство представляет собой или включает фермент, имеющий активность пептид-N-(N-ацетил-β-N-глюкозаминил)аспарагинамидазы. В конкретных вариантах осуществления, композицию клеток обрабатывают, приводят в контакт или инкубируют со средством, которое представляет собой или включает PNGазу F.

**[0190]** В некоторых вариантах осуществления, PNGаза F представляет собой рекомбинантную PNGазу F. В конкретных вариантах осуществления, PNGаза F представляет собой мутантную PNGазу F. В некоторых вариантах осуществления, PNGаза F представляет собой рекомбинантную PNGазу F, клонированную из *Flavobacterium meningosepticum*. В конкретных вариантах осуществления, PNGаза F клонирована из полноразмерного гена PNGазы F из *Flavobacterium meningosepticum*. В конкретных вариантах осуществления, полноразмерный ген PNGазы F из *Flavobacterium meningosepticum* представляет собой ген PNGазы F, описанный в Tarentino et al., *Journal of Biological Chemistry*, 265(12): 6961-6966 (1990). В конкретных вариантах осуществления, полноразмерный ген PNGазы F представляет собой ген PNGазы F, кодирующий полипептид PNGазы F, обозначенный номером доступа в Uniprot P21163.2. В некоторых вариантах осуществления, полноразмерный ген PNGазы F представляет собой ген PNGазы F, кодирующий полипептид PNGазы F с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 61.

**[0191]** В конкретных вариантах осуществления, средство представляет собой или включает PNGазу F, продуцированную с полинуклеотида, клонированного из полноразмерной PNGазы, представляющей собой полноразмерный ген пептид-N-гликозидазы F (PNGазы F) из генома *Flavobacterium meningosepticum*, экспрессированную и очищенную из экспрессирующих T7 векторов pET 29-b (Novagen) и pQE-T7(Qiagen). В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий PNGазу F, содержит находящуюся в рамке считывания C-концевую гистидиновую метку. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидом, кодирующим конструкцию PNGазы F с меткой HIS, трансформируют бактериальный штамм BL21 Star (DE3), несущий ген для T7 РНК-полимеразы под контролем промотора lacUV5, позволяющего высокий уровень индуцируемой изопропил-бета-D-тиогалактопиранозидом (IPTG) экспрессии продуктов генов с экспрессирующих T7 векторов, таких как pET и pQE. В конкретных вариантах осуществления, проводят бактериальную трансформацию и выращивание культуры клеток, бактериальные клетки собирают посредством центрифугирования, и осадки клеток промывают буферами, содержащими ингибиторы протеазы (SigmaFast без ЭДТА). В конкретных вариантах осуществления, лизаты тотального клеточного белка получают с

использованием гомогенизатора высокого давления Avestin C5. В некоторых вариантах осуществления, в способах очистки FPLC для рекомбинантного белка PNGазы F, меченного гистицином, используют колонки Ni-NTA (Qiagen) и IMAC HisTrap HP (GE Healthcare). В некоторых вариантах осуществления, бактериальный клеточный лизат из индуцированных IPTG культур наносят на колонку, и связавшийся полипептид PNGазы F с С-концевой меткой His промывают и элюируют с использованием ступенчатого градиента имидазола в буфере для связывания. В некоторых вариантах осуществления, очищенную PNGазу F с С-концевой меткой подвергают диализу и хранят в буфере PBS. В конкретных вариантах осуществления, средство представляет собой или включает PNGазу, представляющую собой рекомбинантную PNGазу F с С-концевой меткой His или представляющую собой PNGазу F, которая является идентичной PNGазе F, полученной посредством способов, описанных в Powers et al. *Analytical Chemistry*, 85(20):9799-806 (2013).

**[0192]** В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой или включает PNGазу F, представляющую собой коммерчески доступную PNGазу F. Коммерчески доступная PNGаза F включает, но без ограничения, PNGазу F квалификации для протеомики (каталожный # P 7367, Sigma); PNGазу F (каталожный # P0704S и P0704L, New England Biolabs), PNGазу F (каталожный # V4831, Promega), N-гликаназу (каталожный #: GKE-5006A, GKE-5006B, GKE-5006D, GKE-5016A, GKE-5016B, GKE-5016D, GKE-5010B, GKE-5016D, GKE-5020B, GKE-5020D, и GKE-5003, ProZyme) и PNGазу F (каталожный #: E-PNG01, QA Bio), PNGазу RAPID PNGase F (каталожный # P0710S, New England Biolabs), PNGазу PNGASE F PRIME (N-Zyme Scientifics). В конкретных вариантах осуществления, PNGаза F представляет собой или является идентичной PNGASE F PRIME (N-Zyme Scientifics).

**[0193]** В конкретных вариантах осуществления, клетки удаляют из образца, раствора или сред, содержащих высвобожденные поверхностные гликаны. В конкретных вариантах осуществления, гликаны удаляют и/или отделяют из сред или раствора. В некоторых вариантах осуществления, раствор или среды выпаривают. В конкретных вариантах осуществления, раствор или среды выпаривают посредством вакуумного центрифугирования, например, с использованием устройства speedvac. В конкретных вариантах осуществления, гликаны удаляют и/или отделяют из сред или раствора и затем ресуспендируют. В некоторых вариантах осуществления, гликаны можно ресуспендировать в некотором объеме буфера или раствора. В некоторых вариантах осуществления, буфер или раствор является пригодным для хранения. В конкретных вариантах осуществления, буфер является пригодным для использования со способом детекции, идентификации и/или детекции гликанов. В конкретных вариантах осуществления, буфер или раствор является пригодным для химической реакции, например, реакции дериватизации, такой как добавление поддающейся детекции метки.

**[0194]** В конкретных вариантах осуществления, гликаны, например, N-гликаны, модифицируют для улучшения и/или усовершенствования детекции гликанов. Во многих

случаях, гликаны могут не поддаваться простой детекции из-за отсутствия сильного хромофора или флуорофора, или активной группы, поддающейся детекции посредством жидкостной хроматографии и/или масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, ответ оптической плотности и флуоресценции гликана может являться относительно слабым или составлять ниже порога для детекции. В некоторых вариантах осуществления, одним из способов максимизации чувствительности анализа является перевод представляющего интерес соединения, т.е., гликана, в производное, проявляющее лучший ответ для конкретного используемого способа детекции. В конкретных вариантах осуществления, дериватизирующее средство оказывает эффект или влияние на чувствительность и точность анализа в конечном счете посредством максимизации чувствительности, выхода и/или стабильности дериватизированных молекул. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, гликаны (например, N-гликаны), высвобожденные с клеточных поверхностей, дериватируют перед любыми процедурами для анализа или детекции.

**[0195]** В некоторых вариантах осуществления, гликаны дериватируют до анализа посредством HPLC и/или масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, чувствительность детекции N-гликанов посредством существующих способов, например, высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) и/или оптической или масс-спектрометрической (MS) детекции, можно улучшать и/или усиливать посредством стадии дериватизации.

**[0196]** В некоторых вариантах осуществления, гликан, например, N-гликан, дериватируют, чтобы позволять или улучшать детекцию посредством масс-спектрометрии. В конкретных вариантах осуществления, гликан дериватируют, чтобы позволять гликану более просто принимать заряд. В конкретных вариантах осуществления, гликан и/или дериватизированный гликан, который является способным принимать заряд, поддается детекции посредством масс-спектрометра. В некоторых вариантах осуществления, гликан дериватируют посредством добавления аминогруппы, например, третичной аминогруппы.

**[0197]** В некоторых вариантах осуществления, дериватизация представляет собой или включает добавление поддающейся детекции метки к гликанам, например, N-гликаны. В некоторых вариантах осуществления, добавление представляет собой ковалентное присоединение. В конкретных вариантах осуществления, прикрепленная поддающаяся детекции метка увеличивает сигнал и/или уменьшает фоновый шум в ходе детекции N-гликанов, по сравнению с детекцией N-гликанов, которые не содержат прикрепленной поддающейся детекции метки. В конкретных вариантах осуществления, любую из множества поддающихся детекции меток можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, включая, но без ограничения, флуоресцентные метки, радиоактивные метки и/или хемилюминесцентные метки. В конкретных вариантах осуществления, поддающаяся детекции метка представляет собой флуоресцентную метку. В конкретных вариантах осуществления, прикрепление, например, ковалентное

присоединение, флуоресцентной метки не изменяет миграцию N-гликана в колонке, например, колонке, пригодной для HPLC. В конкретных вариантах осуществления, метка представляет собой флуоресцентную метку и позволяет гликану более просто принимать заряд, по сравнению с немеченым гликаном.

**[0198]** В некоторых вариантах осуществления, дериватизацию N-гликанов проводят посредством стандартного в данной области способа. Большое количество способов дериватизации N-гликанов описано, и их обзор приведен в Ruhaak et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397(8): 3457-3481 (2010). В некоторых вариантах осуществления, дериватизацию проводят посредством химической реакции, которая включает две или более стадии реакции. В некоторых вариантах осуществления, дериватизацию проводят посредством реакции восстановительного аминирования, перметилирования, реакции присоединения Михаэля, или мечения гидразидом. В конкретных вариантах осуществления, можно использовать различные соединения, предоставляющие необходимую функциональную группу для реакции мечения. В конкретных вариантах осуществления, дериватизацию проводят посредством химической реакции с одной стадией реакции. Средства для мечения, которые добавляют метку к гликану посредством химической реакции с одной стадией реакции, которые являются пригодными для дериватизации и/или ковалентного присоединения поддающейся детекции метки к N-гликану, включают средства, которые содержат функциональную группу, быстро вступающую в реакцию с аминами (такую как изоцианат или сукцинимидилкарбамат). Такие средства для мечения и флуоресцентные метки описаны в Патентной заявке США No: US 20140242709.

**[0199]** В конкретных вариантах осуществления, N-гликаны метят посредством восстановительного аминирования. В этой реакции, метка, содержащая первичную аминогруппу, вступает в реакцию конденсации с альдегидной группой гликана, с получением в результате имина или шиффова основания, которые восстанавливают посредством восстанавливающего средства с получением вторичного амина. В некоторых вариантах осуществления, реакцию проводят в диметилсульфоксиде, содержащем уксусную кислоту, тетрагидрофуран или метанол. В некоторых вариантах осуществления, восстановительное аминирование приводит к стехиометрическому прикреплению одной метки на N-гликан, позволяя прямую количественную оценку, на основании интенсивности флуоресценции или УФ-поглощения.

**[0200]** Различные метки использовали для восстановительного аминирования гликанов. В некоторых вариантах осуществления, флуоресцентную метку, которая представляет собой или включает 2-аминобензамид (2-AB), 2-аминобензойную кислоту (2-AA), 2-аминопиридин (PA), 2-аминоакридон (AMAC), 2-аминонафталинтрисульфоновую кислоту (ANTS) и 1-аминопирен-3,6,8-трисульфоновую кислоту (APTS), 3-(ацетиламино)-6-аминоакридин (AA-Ac), 6-аминохинолин (6-AQ), 7-аминометил-кумарин (AMC), 2-амино(6-амидобиотинил)пиридин (BAP), 9-

флуоренилметоксикарбонил (FMOС)-гидразид, 1,2-диамино-4,5-метилendioксибензол (DMB) или о-фенилендиамин (OPD), добавляют к гликанам.

**[0201]** В конкретных вариантах осуществления, N-гликаны метят с использованием коммерчески доступной метки. Наборы для мечения являются доступными для меток 2-AB, 2-AA и PA (Ludger), так же как для мечения с использованием APTS (Beckmancoulter) и ANTS (Prozyme). В некоторых вариантах осуществления, средство для мечения и/или флуоресцентная метка представляет собой RapiFluor-MS (Waters Technologies Corporation).

**[0202]** В некоторых вариантах осуществления, средство для мечения содержит флуоресцентную группу и функциональную группу, быстро вступающую в реакцию с аминами (такую как изоцианат или сукцинимидилкарбамат). В некоторых вариантах осуществления, средство для мечения содержит одно или более из третичной аминогруппы или другого активного при MS атома, флуоресцентной группы, и функциональной группы, быстро вступающей в реакцию с аминами (такой как изоцианат или сукцинимидилкарбамат).

**[0203]** В конкретных вариантах осуществления, образец внеклеточного раствора, который содержит гликаны, получают для анализа, например, анализ масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, образец гликанов, например, N-гликанов, очищают до анализа. В некоторых вариантах осуществления, очистка включает любой способ, способный к отделению N-гликанов от любых объектов, которые могут или потенциально могут нарушать, затруднять и/или ослаблять детекцию N-гликанов. В некоторых вариантах осуществления, стадию очистки проводят для удаления N-гликанов от клеточного дебриса, дегликозилированного белка, PNGазы F, компонентов буфера/состава, поверхностно-активных веществ, побочных продуктов реакции мечения, и/или избытка реагентов для мечения и/или дериватизации. В конкретных вариантах осуществления, стадию очистки проводят для меченых гликанов, например, N-гликанов, например, гликанов с ковалентно присоединенными поддающимися детекции метками. В конкретных вариантах осуществления, очистку проводят любым пригодным способом очистки гликанов, включая, но без ограничения, твердофазную экстракцию (SPE), жидкость-жидкостную экстракцию, гель-фильтрацию, хроматографию на бумаге и преципитацию.

**[0204]** В конкретных вариантах осуществления, гликаны, например, N-гликаны, анализируют посредством масс-спектрометрии, например, посредством любого способа масс-спектрометрии, описанного в настоящем описании, например, в разделе I. В конкретных вариантах осуществления, композицию клеток, например, тестируемую композицию T-клеток, анализируют посредством удаления гликанов с поверхности клеток, очистки и дериватизации гликанов, и измерения гликанов с использованием способа масс-спектрометрии, например, LC-MS. В некоторых вариантах осуществления, присутствие, отсутствие, уровень или количество гликанов, например, N-гликанов, присутствующих на поверхности клеток, детектируют или измеряют как считывание

присутствия, отсутствия, уровня или количества одной или более гликотрансфераз. В конкретных вариантах осуществления, присутствие, отсутствие, уровень, или количество гликанов, например, N-гликанов, присутствующих на поверхности клеток, детектируют или измеряют, коррелируют с присутствием, отсутствием, уровнем или количеством одной или более гликотрансфераз, как детектировано в образце, например, посредством геномного способа, такого как РНК-секвенирование или анализ доступного для транспозазы хроматина с использованием секвенирования (АТАС-seq). В конкретных вариантах осуществления, присутствие, отсутствие, уровень или количество гликанов, например, N-гликанов, присутствующих на поверхности клеток, детектируют или измеряют как считывание присутствия, отсутствия, уровня или количества одной или более гликотрансфераз, кодированных посредством MGAT1, MGAT2, MGAT3, MGAT4A, MGAT4B, MGAT5 или MGAT5B.

## **II. КОМПОЗИЦИИ КЛЕТОК**

**[0205]** В некоторых вариантах осуществления, представленные в настоящем описании способы можно использовать для определения, измерения или оценки присутствия, уровня, количества или экспрессии белков, например, поверхностных белков, композиции клеток посредством идентификации профиля масс-спектрометрии композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии идентифицируют любым из представленных способов, описанных в настоящем описании, например, в разделе I. В конкретных вариантах осуществления, способы представляют собой или включают способ масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы можно использовать для оценки или анализа присутствия, отсутствия, количества, уровня и/или относительной распространенности одного или более белков на поверхности клеток из композиции.

**[0206]** В конкретных вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии (например, тестируемый профиль масс-спектрометрии) получают для тестируемой композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток может представлять собой любую композицию клеток, в которой один или более маркеров, признаков, свойств, фенотипов или атрибутов измеряют или желателно измерять посредством любого из способов, представленных в настоящем описании, например, в разделе I, например, посредством получения профиля масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления, тестируемая композиция представляет собой композицию клеток млекопитающих. В частности, тестируемая композиция представляет собой композицию клеток человека. В конкретных вариантах осуществления, композиция тестируемых клеток представляет собой или содержит клетки, которые являются пригодными для генетической инженерии (например, для получения препарата для клеточной терапии), являются собранными в ходе способа генетической инженерии (например, для получения препарата для клеточной терапии) или были генетически модифицированы (например, препарат для клеточной терапии, содержащий генетически модифицированные клетки).

**[0207]** В конкретных вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии получают для тестируемой композиции клеток, например, композиции иммуноцитов, содержащих CAR-T-клетки, для определения или оценки уровней, количеств или изменений белков, например, поверхностных белков. В некоторых вариантах осуществления, уровни, количества или изменения белков, например, поверхностных белков, указывает на функциональные и/или фенотипические характеристики, свойства или признаки клеток, например, в связи с одним или более из жизнеспособности, метаболической активности, состояния дифференцировки, пролиферативной способности, состояния активации или цитолитической активности.

**[0208]** В некоторых вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток представляет собой препарат для клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток представляет собой препарат для клеточной терапии, являющийся кандидатом для введения субъекту, например, субъекту-человеку. В конкретных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток представляет собой препарат для аутологичной клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток представляет собой препарат для терапии иммуноцитами. В конкретных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток представляет собой препарат для аутологичной CAR-T-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток представляет собой композицию клеток, которую можно разводить, перерабатывать или модифицировать для клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления, тестируемый препарат для клеточной терапии представляет собой композицию клеток, которую можно разводить, перерабатывать или модифицировать для аутологичной CAR-T-клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток представляет собой композицию клеток, собранную в ходе способа получения или модификации препарата для клеточной терапии. В различных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток представляет собой композицию клеток, собранных в ходе способа модификации препарата для аутологичной T-клеточной терапии.

**[0209]** В некоторых вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток представляет собой композицию клеток человека, например, иммуноцитов человека, таких как T-клетки, которые будут подвергнуты генетической инженерии, например, для получения композиции модифицированных T-клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки являются пригодными для или будут подвергнуты любому из способов генетической инженерии, описанных в настоящем описании, например, в разделе-III. В конкретных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток представляет собой композицию клеток человека, например, иммуноцитов человека, которые включают генетически модифицированные клетки, подвергнутые способу генетической инженерии, например, для получения композиции модифицированных T-клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки подвергают любому из способов генетической инженерии, описанных в настоящем описании, например, в разделе-III. В

конкретных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток представляет собой композицию Т-клеток, которая является пригодной для или будет подвергнута любому из способов генетической инженерии, описанных в настоящем описании, например, в разделе-III, для получения модифицированной композиции Т-клеток, содержащей Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, например, CAR. В конкретных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток представляет собой модифицированную композицию Т-клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, например, CAR. В конкретных вариантах осуществления, модифицированную композицию Т-клеток подвергают способу генетической инженерии клеток, описанному в настоящем описании, например, в разделе-III.

**[0210]** В различных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток представляет собой композицию клеток человека, например, иммунцитов человека, таких как Т-клетки, собранные в ходе способа получения композиции модифицированных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают в ходе любой стадии или временной точки любого из способов получения модифицированных клеток, описанных в настоящем описании, например, в разделе-III. В конкретных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток содержит активированные или стимулированные Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, активированные или стимулированные Т-клетки инкубировали в стимулирующих условиях, таких как любые из условий, описанных в настоящем описании, например, в разделе III-B. В конкретных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток содержит трансформированные или трансфицированные Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, гетерологичный полинуклеотид, такой как полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор или CAR, введен или доставлен в Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, например, в разделе III-C. В конкретных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток содержит культивированные или размноженные Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, Т-клетки культивировали или размножали в соответствии с любым способом, представленным в настоящем описании, например, в разделе III-D.

**[0211]** В некоторых вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток включает или содержит иммунциты, экспрессирующие рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток содержит Т-клетки, например, CD4+ или CD8+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой рецептор антигена. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой CAR. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой любой CAR, описанный в настоящем описании, например, в разделе II-C-1-a или II-C-1-b. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой рекомбинантный TCR,

например, рекомбинантный TCR, описанный в настоящем описании, например, в разделе II-C-1-c. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой CAR против CD19. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой CAR против BCMA.

**[0212]** В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии получают для более, чем одной тестируемой композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии получают для двух, трех, четырех, пяти, более чем пяти, более чем десяти, более чем двадцати, более чем пятидесяти или более чем 100 тестируемых композиций клеток. В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии получают для более, чем одной тестируемой композиции клеток, для определения среднего арифметического, медианного или среднего уровня или количества одного или более белков, например, поверхностных белков, для множества тестируемых композиций клеток. В некоторых вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии получают для более, чем одной тестируемой композиции клеток, для определения изменчивости или дисперсии уровня или количества одного или более белков, например, поверхностных белков, среди множества тестируемых композиций клеток.

**[0213]** В некоторых вариантах осуществления, тестируемая композиция клеток содержит клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии тестируемой композиции клеток сравнивают с профилем композиции клеток, экспрессирующих отличный рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии тестируемой композиции клеток сравнивают с композицией клеток, не экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии для тестируемой композиции клеток можно сравнивать с профилем масс-спектрометрии для композиции клеток, полученной посредством отличного способа. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии тестируемой композиции клеток сравнивают с отличной композицией клеток с отличной ступени или стадии производственного процесса.

**[0214]** В конкретных вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии тестируемой композиции клеток сравнивают с профилем масс-спектрометрии композиции клеток для клеток, собранных на более ранней стадии способа модификации, например, раньше, чем когда были собраны клетки из тестируемой композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии тестируемой композиции клеток сравнивают с профилем масс-спектрометрии композиции клеток для клеток, собранных на более поздней стадии способа модификации, например, позднее, чем когда были собраны клетки из тестируемой композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии из тестируемой композиции клеток сравнивают с профилем масс-спектрометрии из композиции клеток, которая находилась на той же стадии производственного процесса, но была подвергнута воздействию отличных условий,

например, отличных от условий, воздействию которых подвергали клетки из тестируемой композиции клеток.

**[0215]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии тестируемой композиции клеток, например, тестируемый профиль масс-спектрометрии, сравнивают с эталонным профилем масс-спектрометрии. В конкретных вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии представляет собой теоретический профиль. В некоторых вариантах осуществления, теоретический профиль основан на белках (и их уровнях, количествах или модификациях), по прогнозам, находящихся в клетках или экспрессированных клетками из композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления, теоретический профиль основан на белках (и их уровнях, количествах или модификациях), по прогнозам, находящихся в клетках или экспрессированных клетками из композиции клеток, которую считают являющейся идеальной композицией клеток.

**[0216]** В некоторых вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии получен из эталонной композиции клеток.

**[0217]** В конкретных вариантах осуществления, эталонная композиция клеток содержит клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор также экспрессируется клетками, содержащимися в тестируемой композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления, каждая из эталонной композиции клеток и тестируемой композиции клеток содержит клетки, экспрессирующие одинаковый рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, эталонную композицию клеток получают из клеток, полученных от того же субъекта, что и тестируемая композиция. В конкретных вариантах осуществления, эталонную композицию клеток получают из клеток, полученных от субъекта, отличного от субъекта, от которого получают клетки для получения тестируемой композиции. В конкретных вариантах осуществления, эталонная композиция клеток (i) получена из клеток, полученных от того же субъекта, что и клетки, использованные для получения тестируемой композиции клеток, и (ii) содержит клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, отличный от рецептора клеток в тестируемой композиции. В различных вариантах осуществления, эталонная композиция клеток (i) получена из клеток, полученных от субъекта, отличного от субъекта для клеток, использованных для получения тестируемой композиции клеток, и (ii) содержит клетки, экспрессирующие такой же рекомбинантный рецептор, что и клетки в тестируемой композиции. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой CAR.

**[0218]** В некоторых вариантах осуществления, эталонная композиция клеток содержит клетки, собранные на более ранней стадии способа модификации, чем стадия, на которой были собраны клетки из тестируемой композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления, эталонная композиция клеток содержит клетки, собранные на более поздней стадии способа модификации, чем когда были собраны клетки из

тестируемой композиции клеток. В конкретных вариантах осуществления, эталонная композиция клеток содержит клетки, собранные на той же стадии производственного процесса, что и клетки из тестируемой композиции. В конкретных вариантах осуществления, эталонная композиция клеток содержит клетки, собранные на той же стадии производственного процесса, что и клетки из тестируемой композиции, но подвергнутые воздействию отличных условий.

**[0219]** В конкретных вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии получен из множества эталонных композиций клеток. В конкретных вариантах осуществления, множество включает, включает приблизительно, или включает по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 500 или 1000 эталонных композиций клеток. В конкретных вариантах осуществления, эталонный профиль масс-спектрометрии представляет собой или включает среднее, среднее арифметическое или медианное значение профилей масс-спектрометрии, полученных из эталонного профиля масс-спектрометрии.

#### **А. Типы клеток**

**[0220]** Конкретные варианты осуществления предусматривают, что любую композицию, содержащую клетки, можно оценивать в соответствии с представленным способом. В некоторых вариантах осуществления, популяция клеток представляет собой или содержит линию клеток или первичные клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяция клеток представляет собой или содержит первичные клетки, такие как первичные клетки, полученные от субъекта, например, субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления, популяция клеток представляет собой или содержит стволовые клетки, такие как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления, композиция клеток, например, композиция-источник или ее части, такая как тестируемая композиция клеток, представляет собой композицию, ассоциированную со способом получения композиции клеток, включая связанную с модификацией клеток с использованием рекомбинантной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, композиция клеток представляет собой фармацевтическую композицию.

**[0221]** В конкретных вариантах осуществления, клетки представляют собой или включают эукариотические клетки. В конкретных вариантах осуществления, клетки из композиции клеток представляют собой клетки животных. В некоторых вариантах осуществления, клетки из композиции представляют собой клетки млекопитающих. В конкретных вариантах осуществления, клетки представляют собой клетки мыши, клетки хомяка, клетки крысы или клетки нечеловекообразного примата. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой клетки человека.

**[0222]** В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой клетки из линии клеток, например, клетки яичника китайского хомяка (CHO), линию клеток почки обезьяны CV1, трансформированную SV40 (COS7); линию эмбриональной почки человека 293; клетки почки новорожденного хомяка (ВНК); клетки Сертоли мыши (ТМ4);

клетки почки обезьяны (CVI-76); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT); клетки гепатомы крысы (HTC); клетки NIH/3T3 и клетки TRI. Ссылку на обширный список линий клеток млекопитающих, специалист в данной области может обнаружить в каталоге Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, VA). В некоторых вариантах осуществления, клетки могут принадлежать к множеству типов клеток, например, фибробластам, миобластам, макрофагам или эпителиальным клеткам.

**[0223]** В конкретных вариантах осуществления, клетки из композиции представляют собой или включают стволовые клетки. В конкретных вариантах осуществления, клетки из композиции клеток представляют собой плюрипотентные стволовые клетки, мультипотентные стволовые клетки, олигопотентные стволовые клетки и/или унипотентные стволовые клетки. В конкретных вариантах осуществления, клетки являются индуцированными, например, представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ipsc). В конкретных вариантах осуществления, клетки из композиции представляют собой, например, клетки, находящиеся в процессе перепрограммирования, например, по направлению к плюрипотентности. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой стволовые клетки, находящиеся в процессе дифференцировки.

**[0224]** В некоторых вариантах осуществления, клетки из композиции представляют собой иммунциты. В конкретных вариантах осуществления, композиция клеток содержит одни или более из Т-клеток, В-клеток и/или НК-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки из композиции клеток представляют собой CD3+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой CD4+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, клетки представляют собой CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, одни или более из эффекторных Т-клеток, Т-клеток-помощников, цитотоксических Т-клеток, Т-клеток памяти и супрессорных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой клетки естественные киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

**[0225]** В некоторых вариантах осуществления, композиция клеток представляет собой или включает Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, Т-клетки представляют собой или включают подтипы и субпопуляции Т-клеток, такие как одни или более из наивных Т-клеток ( $T_N$ ), эффекторных Т-клеток ( $T_{эфф}$ ), Т-клеток памяти и их подтипов, таких как стволовые Т-клетки памяти ( $T_{SCM}$ ), центральные Т-клетки памяти ( $T_{CM}$ ), эффекторные Т-клетки памяти ( $T_{EM}$ ) или терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, инфильтрующие опухоль лимфоциты (TIL), незрелых Т-клеток, зрелых Т-клеток, Т-клеток-помощников, цитотоксических Т-клеток,

ассоциированных со слизистыми оболочками инвариантных Т-клеток (MAIT), природных и адаптивных регуляторных Т-клеток (Т-рег), Т-клеток-помощников, таких как TH1-клетки, TH2-клетки, TH3-клетки, TH17-клетки, TH9-клетки, TH22-клетки, фолликулярные Т-клетки-помощники, альфа/бета Т-клеток и дельта/гамма Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой регуляторную Т-клетку (Т-рег). В некоторых вариантах осуществления, клетка дополнительно содержит рекомбинантный FOXP3 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, композиция клеток представляет собой или включает CD3+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, композиция клеток представляет собой или включает CD4+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, композиция клеток представляет собой или включает CD8+ Т-клетки.

**[0226]** В конкретных вариантах осуществления, оценивают поверхностные белки первичных клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция клеток содержит первичные клетки, такие как клетки, выделенные непосредственно от субъекта и/или, выделенные от субъекта и замороженные. В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одну или более подгрупп Т-клеток или других типов клеток, таких как полные популяции Т-клеток, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки и их субпопуляции, такие как субпопуляции, определенные по функции, состоянию активации, зрелости, потенциалу к дифференцировке, способностям к размножению, рециркуляции, локализации и/или персистенции, антигенспецифичности, типу рецептора антигена, присутствию в конкретном органе или компартменте, профилю секреции маркеров или цитокинов, и/или степени дифференцировки. По отношению к субъекту, подлежащему лечению, клетки могут являться аллогенными и/или аутологичными.

**[0227]** В некоторых вариантах осуществления, одна или более клеток из композиции представляют собой модифицированные клетки. В некоторых случаях, одна или более клеток являются модифицированными для содержания рекомбинантной нуклеиновой кислоты, например, содержания гетерологичной нуклеиновой кислоты, и/или экспрессии гетерологичного белка. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует рекомбинантный белок. В некоторых случаях, рекомбинантный белок может представлять собой любой белок, который желательно экспрессировать или получать посредством рекомбинантной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный белок представляет собой рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой или включает вирусный вектор, например, лентивирусный или ретровирусный вектор, который переносят или вводят в клетку для экспрессии рекомбинантного белка.

### **В. Композиции модифицированных клеток**

**[0228]** В конкретных вариантах осуществления, модифицированные клетки содержат гетерологичный полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой

химерный рецептор или рецептор антигена, такой как химерный рецептор антигена (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). В конкретных вариантах осуществления, модифицированные клетки продуцируют, производят или получают любым способом, описанным в настоящем описании, например, в разделе III. В конкретных вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии измеряют, определяют или получают для модифицированных клеток, которые продуцированы, произведены или получены способом, описанным в настоящем описании, например, в разделе-III

**[0229]** В некоторых вариантах осуществления, все или часть клеток в композиции содержат или являются модифицированными для содержания сконструированного рецептора, такого как химерный рецептор антигена (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). В конкретных вариантах осуществления, все или часть клеток в композиции экспрессирует сконструированный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, композиции, содержащие модифицированные клетки, являются обогащенными по таким клеткам. В конкретных вариантах осуществления, клетки конкретного типа, такие как Т-клетки, или CD8+ или CD4+ Т-клетки, обогащают или отбирают. В конкретных вариантах осуществления, композиция клеток представляет собой терапевтическую и/или фармацевтическую композицию клеток, например, для адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии измеряют, определяют или получают для терапевтической композиции клеток, например, препарата для клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии измеряют, определяют или получают для композиции модифицированных клеток, содержащей CAR+Т-клетки.

### **1. Рекомбинантные рецепторы**

**[0230]** В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии измеряют, определяют или получают для модифицированных клеток, таких как иммунциты, такие как Т-клетки, экспрессирующие один или более рекомбинантных рецептор(ов). Среди рецепторов присутствуют рецепторы антигенов и рецепторы, содержащие один или более их компонентов. Рекомбинантные рецепторы могут включать химерные рецепторы, такие как рецепторы, содержащие лигандсвязывающие домены или их связывающие фрагменты и внутриклеточные передающие сигналы домены или области, функциональные не относящиеся к TCR рецепторы антигенов, химерные рецепторы антигенов (CAR), Т-клеточные рецепторы (TCR), такие как рекомбинантные или трансгенные TCR, химерный рецептор аутоантител (CAAR) и компоненты любых из вышеуказанных. Рекомбинантный рецептор, такой как CAR, как правило, включает внеклеточный связывающий антиген (или лиганд) домен, связанный с одним или более внутриклеточными передающими сигналами компонентами, в некоторых аспектах, посредством линкеров и/или трансмембранных домена(доменов). В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки экспрессируют два или более рецептора, которые содержат различные компоненты, домены или области. В некоторых аспектах, два или более рецептора позволяют пространственную или временную регуляцию или

контроль специфичности, активности, связывания антигена (или лиганда), функцию и/или экспрессию рекомбинантных рецепторов.

**[0231]** В некоторых вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии, полученные для различных композиций клеток, экспрессирующих одинаковый рекомбинантный рецептор, например, CAR или рекомбинантный TCR, сравнивают. В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии, полученные для различных композиций клеток, экспрессирующих одинаковый рекомбинантный рецептор, полученных различными способами модификации, сравнивают. В некоторых вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии можно сравнивать для оценки изменений свойств клеток в ответ на различные способы модификации. В некоторых вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии сравнивают для детекции сходства или различий уровней или количеств рекомбинантного рецептора, присутствующего на поверхности клеток. В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии сравнивают для детекции сходства или различий уровней или количеств посттрансляционных модификаций, например, конъюгации гликанов, для рекомбинантного рецептора.

**[0232]** В некоторых вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии, полученные для различных композиций клеток, экспрессирующих одинаковый рекомбинантный рецептор, например, CAR или рекомбинантный TCR, получают, например, для определения или расчета среднего, медианного или среднего арифметического профиля масс-спектрометрии, или его части. В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии, полученные для различных композиций клеток, экспрессирующих одинаковый рекомбинантный рецептор, получают, например, для определения или расчета среднего, медианного или среднего арифметического уровня или количества одного или более индивидуальных белков, экспрессированных на поверхности клеток из композиций. В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии, полученные для различных композиций клеток, экспрессирующих одинаковый рекомбинантный рецептор, получают для определения или расчета среднего, медианного или среднего арифметического уровня или количества одной или более индивидуальных посттрансляционных модификаций для одного или более белков, экспрессированных на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, средний, средний арифметический или медианный профиль масс-спектрометрии, или его часть может служить в качестве эталонного белкового профиля.

**[0233]** В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии, полученные для различных композиций клеток, экспрессирующих одинаковый рекомбинантный рецептор, например, CAR или рекомбинантный TCR, получают для определения или расчета изменчивости или дисперсии среди профилей масс-спектрометрии или их частей. В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии, полученные для различных композиций клеток, экспрессирующих одинаковый рекомбинантный рецептор, получают для определения или расчета

изменчивости или дисперсии среди композиций клеток по количеству одного или более индивидуальных белков, экспрессированных на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии, полученные для различных композиций клеток, экспрессирующих одинаковый рекомбинантный рецептор, получают для определения или расчета изменчивости или дисперсии среди композиции клеток по количеству одной или более индивидуальных посттрансляционных модификаций.

*а. Химерные рецепторы антигенов (CAR)*

**[0234]** В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессируют рекомбинантный рецептор, такой как 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, антиген 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, например, нормальными клетками или тканями. В других вариантах осуществления, антиген является экспрессированным на нормальных клетках и/или является экспрессированным на модифицированных клетках. В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, например, CAR, включает одну или более областей или доменов, выбранных из внеклеточных связывающих лиганд (например, антиген) областей или доменов, например, любое из антител или фрагментов, описанных в настоящем описании, и внутриклеточную передающую сигналы область. В некоторых вариантах осуществления, связывающие лиганд (например, антиген) область или домен представляют собой или включают scFv или однодоменное антитело  $V_H$ , и внутриклеточные передающие сигналы область или домен представляют собой или содержат ИТАМ. В некоторых аспектах, внутриклеточные передающие сигналы область или домен включают передающий сигналы домен из цепи CD3-дзета (CD3 $\zeta$ ) или ее части. В некоторых аспектах, внеклеточные связывающие лиганд (например, антиген) область или домен(ы) и внутриклеточные передающие сигналы область или домен(ы) связаны или соединены посредством одного или более линкеров и/или трансмембранного домена(доменов). В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена включает трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной передающей сигналы областью.

**[0235]** Иллюстративные рецепторы антигенов, включая CAR, и способы конструирования и введения таких рецепторов в клетки, включают способы, описанные, например, в Публикациях международных патентных заявок No. WO2000/14257, WO2013/126726, WO2012/129514, WO2014/031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, в публикациях Патентных заявок США No. 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 No. 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; и 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 2014/055668. Примеры CAR включают CAR, как описано в любой из вышеупомянутых публикаций, таких как WO2014/031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, US 7446190, US 8389282, Kochenderfer et al., 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; и Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177).

**[0236]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, например, рецептор антигена, содержит внеклеточный связывающий антиген или лиганд домен, который связывается, например, специфически связывается, с антигеном, лигандом и/или маркером. Среди рецепторов антигенов присутствуют функциональные не относящиеся к TCR рецепторы антигенов, такие как химерные рецепторы антигенов (CAR). В некоторых вариантах осуществления, рецептор антигена представляет собой CAR, содержащий внеклеточный узнающий антиген домен, который специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления, CAR сконструирован со специфичностью для конкретного антигена, маркера или лиганда, такого как антиген, экспрессирующийся в клетках конкретного типа, подлежащих 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 более связывающих лиганд (например, антиген) молекул, таких как один или более антигенсвязывающих фрагментов, доменов или частей, или один или более переменных доменов антител, и/или молекул антител. В некоторых вариантах осуществления, CAR включает антигенсвязывающую часть или части молекулы антитела, такую как одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), происходящий из переменной тяжелой ( $V_H$ ) и переменной легкой ( $V_L$ ) цепей моноклонального антитела (mAb), или однодоменного антитела (sdAb), такого как sdFv, нанотело,  $V_{HN}$  и  $V_{NAR}$ . В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит переменные области антитела, соединенные гибким линкером.

**[0237]** В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), специфически узнающий антиген или лиганд, такой как интактный антиген, экспрессированный на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления, антиген или лиганд представляет собой белок, экспрессированный на поверхности клеток. 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 не являющимися объектом нацеливания клетками или тканями. В других вариантах осуществления, антиген является экспрессированным на нормальных клетках и/или является экспрессированным на модифицированных клетках.

**[0238]** В некоторых вариантах осуществления, 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 В-, Т- и миелоидные лейкозы, лимфомы, и множественные миеломы.

**[0239]** В некоторых вариантах осуществления, антиген или лиганд представляет собой антиген опухоли или маркер злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления, антиген или лиганд антигена представляет собой или включает интегрин  $\alpha\beta6$  (интегрин  $\alpha\beta6$ ), антиген созревания В-клеток (BCMA), В7-Н3, В7-Н6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раково/тестикулярный антиген, раково/тестикулярный антиген 1В (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин А2, лиганд 1 хемокинов с мотивом С-С (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4), белок эпидермальный фактор роста (EGFR), укороченный белка 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 В2, рецептор эфрина А2 (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 5D (GPCR5D), 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 А1 (HLA-A1), человеческий лейкоцитарный антиген А2 (HLA-A2), рецептор альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), рецептор, содержащий домен вставки киназы (kdr), легкую цепь каппа, молекулу клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитоп CE7 из L1-CAM, член А 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 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-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, подвергаемые нацеливанию посредством рецепторов, 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. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой или включает специфический для патогена или экспрессированный патогеном антиген, такой как вирусный антиген (например, вирусный антиген из HIV, HCV, HBV), бактериальные антигены и/или паразитарные антигены.

**[0240]** 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.

**[0241]** В некоторых вариантах осуществления, домены scFv и/или домены  $V_H$  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). Антитело FMC63 содержит CDR H1, указанную в SEQ ID NO: 38; CDR H2, указанную в SEQ ID NO:39; CDR H3, указанную в SEQ ID NO: 40 или 54; и CDR L1, указанную в SEQ ID NO: 35; CDR L2, указанную в SEQ ID NO:36 или 55; и CDR L3, указанную в SEQ ID NO:37 или 56. Антитело FMC63 содержит переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41, и переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID

NO: 42. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит вариабельную легкую цепь, содержащую последовательность CDR L1 из SEQ ID NO:35, последовательность CDR L2 из SEQ ID NO:36 и последовательность CDR L3 из SEQ ID NO:37, и/или вариабельную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR H1 из SEQ ID NO:38, последовательность CDR H2 из SEQ ID NO:39 и последовательность CDR H3 из SEQ ID NO:40, или вариант любого из вышеуказанных, имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит вариабельную область тяжелой цепи FMC63, указанную в SEQ ID NO:41, и вариабельную область легкой цепи FMC63, указанную в SEQ ID NO:42, или вариант любого из вышеуказанных, имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная тяжелая и вариабельная легкая цепи соединены посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, линкер указан в SEQ ID NO:58. 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:57, или последовательностью, имеющей 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:57. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:43, или последовательность, имеющую 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:43.

**[0242]** В некоторых вариантах осуществления, scFv и/или домен  $V_H$  происходят из SJ25C1. SJ25C1 представляет собой мышинное моноклональное антитело IgG1, образованное против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., et al. (1987). Leucocyte typing III. 302). Антитело SJ25C1 содержит CDR H1, H2 и H3, указанные в SEQ ID NO: 47-49, соответственно, и последовательности CDR L1, L2 и L3, указанные в SEQ ID NO: 44-46, соответственно. Антитело SJ25C1 содержит вариабельную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи ( $V_L$ ), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления, svFv содержит вариабельную легкую цепь, содержащую последовательность CDR L1, указанную в SEQ ID NO:44; CDR L2, указанную в SEQ ID NO: 45; и CDR L3, указанную в SEQ ID NO:46; и/или вариабельную тяжелую цепь, содержащую CDR H1, указанную в SEQ ID NO:47, CDR H2, указанную в SEQ ID NO:48, и CDR H3, указанную в SEQ ID NO:49, или вариант любого из вышеуказанных, имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область тяжелой цепи SJ25C1, указанную в SEQ ID NO:50 и переменную область легкой цепи SJ25C1, указанную в SEQ ID NO:51, или вариант любого из вышеуказанных, имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления, переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, линкер указан в SEQ ID NO:52. 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:53, или последовательность, имеющую 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:53.

**[0243]** В некоторых аспектах, CAR содержит связывающий лиганд (например, антиген) домен который связывает или узнает, например, специфически связывает, универсальную метку или универсальный эпитоп. В некоторых аспектах, связывающий домен может связывать молекулу, метку, полипептид и/или эпитоп, которые могут быть соединены с другой связывающей молекулой (например, антителом или антигенсвязывающим фрагментом), узнающий антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением. Иллюстративные метка или эпитоп включают краситель (например, флуоресцеинизотиоцианат) или биотин. В некоторых аспектах, связывающая молекула (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент) соединена с меткой, которая узнает антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, например, антиген опухоли, вместе с модифицированной клеткой, экспрессирующей CAR, специфический для метки, чтобы вызывать цитотоксичность или другие эффекторные функции модифицированной клетки. В некоторых аспектах, специфичность CAR для антигена, ассоциированного с заболеванием или нарушением, обеспечивают посредством снабженной меткой связывающей молекулы (например, антитела), и различные снабженные метками связывающие молекулы можно использовать для нацеливания на различные антигены. Иллюстративные CAR, специфические для универсальной метки или универсального эпитопа, включают CAR, описанные, например, в U.S. 9233125, WO 2016/030414, Urbanska et al., (2012) *Cancer Res* 72: 1844-1852, и Tamada et al., (2012). *Clin Cancer Res* 18:6436-6445.

**[0244]** В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит подобное TCR антитело, такое как антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), которое специфически узнает внутриклеточный антиген, такой как опухолеассоциированный антиген, представленный на поверхности клетки в форме комплекса главный комплекс гистосовместимости (МНС)-пептид. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающую часть, узнающие комплекс МНС-

пептид, можно экспрессировать на клетках как часть рекомбинантного рецептора, такого как рецептор антигена. Среди рецепторов антигенов присутствуют функциональные не относящиеся к Т-клеточному рецептору (TCR) рецепторы антигенов, такие как химерные рецепторы антигенов (CAR). В некоторых вариантах осуществления, CAR, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, имеющие подобную TCR специфичность, направленную против комплексов пептид-МНС, также может быть обозначен как подобный TCR CAR. В некоторых вариантах осуществления, CAR представляет собой подобный TCR CAR, и антиген представляет собой процессированный пептидный антиген, такой как пептидный антиген из внутриклеточного белка, который, подобно TCR, осуществляет узнавание на поверхности клетки в контексте молекулы МНС. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфический для комплекса МНС-пептид, из подобного TCR CAR, соединен с одним или более 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.

**[0245]** 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  $\alpha$ -цепь, в некоторых случаях, с тремя  $\alpha$ -доменами, и нековалентно связанный  $\beta$ 2-микроглобулин. Как правило, молекулы МНС класса II состоят из двух трансмембранных гликопротеинов,  $\alpha$  и  $\beta$ , 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).

**[0246]** 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.

**[0247]** 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.

**[0248]** 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).

**[0249]** 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.

**[0250]** 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 более остатках CDR или более CDR. См., например, Публикацию патентной заявки США No. US20020150914, US20140294841; и Cohen CJ. et al. (2003) *J Mol. Recogn.* 16:324-332.

**[0251]** 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')<sub>2</sub>, фрагменты Fab', фрагменты Fv, фрагменты рекомбинантного IgG (rIgG), переменные области тяжелой цепи (V<sub>H</sub>), способные специфически связывать антиген, одноцепочечные фрагменты антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), и однодоменные антитела (например, sdAb, sdFv, нанотело, V<sub>H</sub>H или V<sub>NAR</sub>) или фрагменты. 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, тандемный ди-scFv, тандемный 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. В некоторых аспектах, CAR представляет собой биспецифический CAR, например, содержащий два антигенсвязывающих домена с различной специфичностью.

**[0252]** 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')<sub>2</sub>, 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.

**[0253]** 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')<sub>2</sub>; диатела; линейные антитела; переменные области тяжелой цепи (V<sub>H</sub>), одноцепочечные молекулы антител, такие как scFv и однодоменные антитела V<sub>H</sub>; и мультиспецифические антитела, сформированные из фрагментов антител. В конкретных вариантах осуществления, антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи, такие как scFv.

**[0254]** 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<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, 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<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> может являться достаточным для обеспечения специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, связывающие конкретный антиген, можно выделять с использованием домена V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V<sub>L</sub> или V<sub>H</sub>, соответственно. См., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

**[0255]** Однодоменные антитела (sdAb) представляют собой фрагменты антител, содержащие весь или часть переменной области тяжелой цепи, или весь или часть переменной области 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. Иллюстративные однодоменные антитела включают sdFv, нанотело, V<sub>H</sub>N или V<sub>NAR</sub>.

**[0256]** 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.

**[0257]** «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.

**[0258]** Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена, включая подобные TCR CAR, включает внеклеточный фрагмент, содержащий антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент включает scFv. В некоторых аспектах, антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно получать посредством скрининга множества, например, библиотеки, антигенсвязывающих фрагментов или молекул, например, посредством скрининга библиотеки scFv по связыванию со специфическим антигеном или лигандом.

**[0259]** В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, например, химерный рецептор антигена, включает внеклеточную часть, содержащую один или более связывающих лиганд (например, антиген) доменов, таких как антитело или его фрагмент, и одну или более внутриклеточных передающих сигнал областей или доменов (также взаимозаменяемо называемых цитоплазматическими передающими сигнал доменами или областями). В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, например, CAR, дополнительно включает спейсер и/или трансмембранный домен, или часть. В некоторых аспектах, спейсер и/или трансмембранный домен может соединять внеклеточную часть, содержащую связывающий лиганд (например, антиген) домен, и внутриклеточные передающие сигнал область(области) или домен(ы).

**[0260]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, такой как CAR, дополнительно включает спейсер, который может представлять собой или включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, или ее вариант или модифицированный вариант, такую как шарнирная область, например, шарнирная область IgG4 и/или C<sub>H</sub>1/C<sub>L</sub>, и/или область Fc. 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 спейсерной областью 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. 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 аминокислоты, или приблизительно от 10 до 15 аминокислот, и включая 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. В некоторых вариантах осуществления, спейсер составляет менее чем 250 аминокислот в длину, менее чем 200 аминокислот в длину, менее чем 150 аминокислот в длину, менее чем 100 аминокислот в длину, менее чем 75 аминокислот в длину, менее чем 50 аминокислот в длину, менее чем 25 аминокислот в длину, менее чем 20 аминокислот в длину, менее чем 15 аминокислот в длину, менее чем 12 аминокислот в длину, или менее чем 10 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления, спейсер составляет от или приблизительно от 10 до 250 аминокислот в длину, от 10 до 150 аминокислот в длину, от 10 до 100 аминокислот в длину, от 10 до 50 аминокислот в длину, от 10 до 25 аминокислот в длину, от 10 до 15 аминокислот в длину, 15 до 250 аминокислот в длину, от 15 до 150 аминокислот в длину, от 15 до 100 аминокислот в длину, от 15 до 50 аминокислот в длину, 15 до 25 аминокислот в длину, от 25 до 250 аминокислот в длину, от 25 до 100 аминокислот в длину, от 25 до 50 аминокислот в длину, от 50 до 250 аминокислот в длину, от 50 до 150 аминокислот в длину, от 50 до 100 аминокислот в длину, от 100 до 250 аминокислот в длину, от 100 до 150 аминокислот в длину или от 150 до 250 аминокислот в длину. Иллюстративные спейсеры включают шарнир IgG4 отдельно, шарнир IgG4, связанный с доменами C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3, или шарнир IgG4, связанный с доменом C<sub>H</sub>3. 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.

**[0261]** 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, указанной в SEQ ID NO: 2. В других вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами C<sub>H</sub>2 и/или C<sub>H</sub>3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3, такой как указано в SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный только с доменом C<sub>H</sub>3, такой как указано в SEQ ID NO:3. 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.

**[0262]** 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 более из шарнира, последовательности(последовательностей) C<sub>H</sub>2 и/или C<sub>H</sub>3, происходящих из IgG4, IgG2, и/или IgG2 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, спейсер может содержать мутации, такие как одна или более одиночных аминокислотных мутаций в одном или более 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 последовательности области C<sub>H</sub>2 константной области тяжелой цепи IgG4, указанной в SEQ ID NO: 60 (No. доступа в Uniprot P01861; положение, соответствующее положению 297 по нумерации EU и положение 79 последовательности шарнир-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 спейсер, указанной в SEQ ID NO:4) или замена N на Q в положении, соответствующем положению 176 в последовательности области C<sub>H</sub>2 константной области тяжелой цепи IgG2, указанную в SEQ ID NO: 59 (No. доступа в Uniprot P01859; положение, соответствующее положению 297 по нумерации EU).

**[0263]** В некоторых аспектах, спейсер представляет собой полипептидный спейсер, такой как один или более, выбранных из того, который: (a) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина или его модифицированного варианта, или содержит приблизительно 15 аминокислот или менее, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, (b) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно, шарнира IgG4 или его

модифицированного варианта, и/или содержит приблизительно 15 аминокислот или менее, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, или (с) имеет или имеет приблизительно 12 аминокислот в длину и/или содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно, IgG4, или его модифицированного варианта; или (d) состоит из или содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 1, 3-5 или 27-34, или вариант любого из вышеуказанного, имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ним, или (е) содержит или состоит из формулы  $X_1PPX_2P$ , где  $X_1$  представляет собой глицин, цистеин или аргинин, и  $X_2$  представляет собой цистеин или треонин.

**[0264]** В некоторых вариантах осуществления, связывающий лиганд (например, антиген) или узнающий домен CAR является связанным с одним или более внутриклеточными передающими сигналами компонентами, такими как внутриклеточные передающие сигналы область или домен, и/или передающие сигналы компоненты, имитирующие активацию через комплекс рецептора антигена, такой как комплекс TCR, и/или передачу сигнала посредством другого рецептора поверхности клетки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий компонент (например, антитело) является связанным с одним или более трансмембранными и внутриклеточными передающими сигналами областью(областями) или доменом(доменами). В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен слит с внеклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления, используют трансмембранный домен, естественным образом ассоциированный с одним из доменов в рецепторе, например, CAR. В некоторых случаях, трансмембранный домен отбирают или модифицируют посредством замены аминокислот, для исключения связывания таких доменов с трансмембранными доменами одинаковых или различных поверхностных мембранных белков для минимизации взаимодействий с другими членами комплекса рецептора.

**[0265]** 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 (4-1BB) или 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). В некоторых аспектах,

трансмембранный домен содержит трансмембранную часть из CD28 или его варианта. Внеклеточный и трансмембранный домен могут быть связаны напрямую или опосредованно. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный и трансмембранный домен связаны посредством спейсера, такого как любой, описанный в настоящем описании.

**[0266]** 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 трансмембранный домен, содержащий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 8 или последовательность аминокислот, имеющую по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO:8; в некоторых вариантах осуществления, содержащая трансмембранный домен часть рекомбинантного рецептора содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, имеющую по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ней.

**[0267]** В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, например, CAR, включает внутриклеточные передающие сигналы область или домен (также взаимозаменяемо называемые цитоплазматическими передающими сигналами доменом или областью). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная передающая сигналы область содержит внутриклеточный передающий сигналы домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные передающие сигналы область или домен представляют собой или содержат передающий первичные сигналы домен, передающий сигналы домен, способный стимулировать и/или индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, передающий сигналы домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) (например, внутриклеточные передающие сигналы домен или область цепи CD3-дзета (CD3ζ) или их функциональный вариант или передающую сигналы часть), и/или передающий сигналы домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, например, CAR, включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, и внутриклеточные передающие сигналы область или домен.

**[0268]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, например, CAR, включает по меньшей мере один внутриклеточный передающий сигналы компонент или компоненты, такие как внутриклеточные передающие сигналы область или домен. Среди внутриклеточных передающих сигналы областей присутствуют области, 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 сигналы доменом CAR.

**[0269]** В некоторых вариантах осуществления, при связывании CAR, цитоплазматический домен или внутриклеточная передающая сигналы область CAR стимулирует и/или активирует по меньшей мере один 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 внутриклеточных передающих сигналы области или домена 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 такую же функциональную способность. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные передающие сигналы области, например, содержащие внутриклеточный домен или домены, включают цитоплазматические последовательности области или домена, вовлеченные в предоставление костимулирующего сигнала.

**[0270]** В некоторых вариантах осуществления, рецептор включает внутриклеточный компонент из комплекса TCR, такой как цепь CD3 TCR, опосредующая активацию Т-клетки и цитотоксичность, например, цепь CD3-дзета. Таким образом, в некоторых аспектах, антигенсвязывающий или узнающий антиген домен является связанным с одним или более модулями передачи сигналов клеткам. В некоторых вариантах осуществления, модули передачи сигналов клеткам 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 более дополнительных молекул, таких как рецептор Fc гамма (FcR  $\gamma$ ), CD8-альфа, CD8-бета, CD4, CD25, или CD16. Например, в некоторых аспектах, CAR включает химерную молекулу между CD3-дзета (CD3 $\zeta$ ) или FcR  $\gamma$  и одним или более из CD8-альфа, CD8-бета, CD4, CD25 или CD16.

**[0271]** В контексте природного TCR, полная активация, как правило, требует не только передачи сигналов через TCR, но также костимулирующего сигнала. Активацию

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

**[0272]** В некоторых аспектах, CAR включает первичную цитоплазматическую передающую сигналы область, которая регулирует первичную стимуляцию и/или активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические передающие сигналы область(области), которые действуют стимулирующим образом, могут содержать мотивы передачи сигналов, известные как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические передающие сигналы область(области) включают ITAM, происходящие из TCR или CD3-дзета (CD3 $\zeta$ ), рецептора Fc (FcR) гамма или FcR бета. В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматические передающие сигналы области или домены в CAR содержит(содержат) цитоплазматический передающий сигналы домен, его часть или последовательность, происходящую из CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная (или цитоплазматическая) 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 $\zeta$  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 или по меньшей мере 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.

**[0273]** Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, чтобы способствовать полной стимуляции и/или активации, один или более компонентов для подачи вторичного или костимулирующего сигнала также включают в CAR. В других вариантах осуществления, CAR не включает компонент для подачи костимулирующего сигнала. В некоторых аспектах, дополнительный CAR экспрессируется в той же самой клетке и обеспечивает компонент для подачи вторичного или костимулирующего сигнала.

**[0274]** В некоторых вариантах осуществления, CAR включает передающую сигналы область и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такого как CD28, 4-1BB, OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, ICOS и/или другие костимулирующие рецепторы. В некоторых аспектах, один и тот же CAR включает как

первичную цитоплазматическую передающую сигналы область, так и костимулирующие передающие сигналы компоненты.

**[0275]** В некоторых вариантах осуществления, один или более различных рекомбинантных рецепторов могут содержать одно или более различных внутриклеточных передающих сигналы области(областей) или домен(доменов). В некоторых вариантах осуществления, первичная цитоплазматическая передающая сигналы область включена в один CAR, в то время как костимулирующий компонент предоставлен другим рецептором, например, 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).

**[0276]** 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.

**[0277]** В некоторых вариантах осуществления, CAR включает один или более, например, два или более, костимулирующих доменов и первичных цитоплазматических передающих сигналы областей, в цитоплазматической части. Иллюстративные CAR включают внутриклеточные компоненты, такие как внутриклеточные передающие сигналы область(области) или домен(ы) CD3-дзета, CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D и/или ICOS. В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена содержит внутриклеточные передающие сигналы область или домен костимулирующей молекулы Т-клетки, например, из CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D и/или ICOS, в некоторых случаях, химерный между трансмембранным доменом и внутриклеточными передающими сигналы областью или доменом. В некоторых аспектах, костимулирующая молекула Т-клетки представляет собой один или более CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D и/или ICOS.

**[0278]** В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные передающие сигналы область или домен содержат 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 нативного 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 или по меньшей мере 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 внутриклеточные костимулирующие передающие сигналы область или домен CD137(4-1BB), или их функциональный вариант или часть, такие как 42-аминокислотный цитоплазматический домен из 4-1BB человека (No. доступа Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, такие как последовательность аминокислот, указанная в SEQ ID NO: 12, или последовательность аминокислот, имеющая по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

**[0279]** В некоторых случаях, CAR обозначают как CAR первого, второго, третьего или четвертого поколения. В некоторых аспектах, CAR первого поколения представляет собой CAR, обеспечивающий единственно первичный стимулирующий или активирующий сигнал, например, через 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 внутриклеточные передающие сигналы область(области) или домен(ы) из одного или более костимулирующих рецепторов, таких как CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS и/или другие костимулирующие рецепторы; в некоторых аспектах, CAR третьего поколения представляет собой CAR, включающий множество костимулирующих доменов из различных костимулирующих рецепторов, например, выбранных из CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS и/или других костимулирующих рецепторов; в некоторых аспектах, CAR четвертого поколения представляет собой CAR, включающий три или более костимулирующих домена из различных костимулирующих рецепторов, например, выбранных из CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS и/или других костимулирующих рецепторов.

**[0280]** В некоторых вариантах осуществления, клетку модифицируют для экспрессии одного или более дополнительных молекул и/или полипептидов, и/или комбинаторные способы и/или способы множественного нацеливания используют для регуляции, контроля, или модуляции функции и/или активности CAR. Иллюстративные способы, используемые для CAR, и комбинаторные способы описаны, например, в разделе комбинаторные способы и множественное нацеливание, описанном ниже.

**[0281]** 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 внутриклеточную передающую сигналы область, содержащую 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 его функциональный вариант, и внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий передающую сигналы часть

4-1BB или ее функциональный вариант и передающую сигналы часть CD3-дзета или его функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления, рецептор дополнительно включает спейсер, содержащий часть молекулы Ig, например, молекулы Ig человека, такой как шарнир Ig, например, шарнир IgG4, такой как содержащий только шарнир спейсер.

**b. Химерный рецептор аутоантител (CAAR)**

**[0282]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор аутоантител (CAAR). В некоторых вариантах осуществления, CAAR связывает, например, специфически связывает, или узнает, аутоантитело. 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.

**[0283]** В некоторых вариантах осуществления, CAAR содержит связывающий аутоантитело домен, трансмембранный домен и одно или более внутриклеточных передающих сигналы областей или доменов (также взаимозаменяемо называемых цитоплазматическими передающими сигналами доменом или областью). 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 стимулировать и/или индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, компонент передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора (TCR) (например, внутриклеточный передающий сигналы домен или область цепи CD3-дзета (CD3 $\zeta$ ), или их функциональный вариант или передающая сигналы часть), и/или передающий сигналы домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

**[0284]** 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 состоянием 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.

*с. Т-клеточные рецепторы (TCR)*

**[0285]** В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающую часть, узнающие внутриклеточный и/или пептидный эпитоп или Т-клеточный эпитоп полипептида-мишени, такого как антиген опухоли, вирусный или аутоиммунный белок. В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор представляет собой или включает рекомбинантный TCR.

**[0286]** В некоторых вариантах осуществления, «Т-клеточный рецептор» или «TCR» представляет собой молекулу, которая содержит переменные цепи  $\alpha$  и  $\beta$  (также известные как TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , соответственно) или переменные цепи  $\gamma$  и  $\delta$  (также известные как TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , 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  $\gamma\delta$ , 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).

**[0287]** 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, антигенсвязывающие 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  $\alpha$ -цепь ( $V_\alpha$ ) и

вариабельная  $\beta$ -цепь ( $V_\beta$ ) TCR, или их антигенсвязывающие фрагменты, достаточные для формирования участка связывания для связывания со специфическим комплексом МНС-пептид.

**[0288]** В некоторых вариантах осуществления, вариабельные домены TCR содержат гипервариабельные 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 вариабельной 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 вариабельной 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, вариабельная область  $\beta$ -цепи может содержать дополнительную гипервариабельную область (CDR4 или HVR4), которая, как правило, вовлечена в связывание суперантигена, а не в узнавание антигена (Kotb (1995) *Clinical Microbiology Reviews*, 8:411-426).

**[0289]** 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 вариабельный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост на C-конце. В некоторых вариантах осуществления, TCR ассоциирован с инвариантными белками из комплекса CD3, вовлеченными в опосредование передачи сигнала.

**[0290]** В некоторых вариантах осуществления, цепь TCR содержит один или более константных доменов. Например, внеклеточная часть данной цепи TCR (например,  $\alpha$ -цепь или  $\beta$ -цепь) может содержать два иммуноглобулиноподобных домена, таких как вариабельный домен (например,  $V_\alpha$  или  $V_\beta$ ; 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  $\alpha$ -цепи или  $C\alpha$ , как правило, положения 117-259 цепи на основании нумерации Kabat или константный домен  $\beta$  цепи, или  $C\beta$ , 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  $\alpha$  и  $\beta$  цепей, так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

**[0291]** 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 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  и CD3 $\zeta$ ) содержат один или более иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов или ITAM, которые вовлечены в способность комплекса TCR передавать сигналы.

**[0292]** В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит различные домены или области. В некоторых случаях, точные домен или область могут меняться, в зависимости от конкретного моделирования структуры или гомологии, или других признаков, использованных для описания конкретного домена. Понятно, что ссылки на аминокислоты, включая конкретную последовательность, указанную в SEQ ID NO, использованные для описания доменной организации рекомбинантного рецептора, например, TCR, приведены для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения представленных вариантов осуществления. В некоторых случаях, конкретный домен (например, переменный или константный) может быть на несколько аминокислот (например, на одну, две, три или четыре) длиннее или короче. В некоторых аспектах, остатки TCR являются известными или могут быть идентифицированы в соответствии с системой нумерации Международной иммуногенетической информационной системы (IMGT) (см., например, [www.imgt.org](http://www.imgt.org); см. также, Lefranc et al. (2003) *Developmental and Comparative Immunology*, 27:55-77; и *The T Cell Factsbook 2nd Edition*, Lefranc and LeFranc Academic Press 2001). С использованием этой системы, последовательности CDR1 внутри цепи  $V\alpha$  и/или цепи  $V\beta$  TCR соответствуют аминокислотам, присутствующим между остатками номер 27-38, включительно,

последовательности CDR2 внутри цепи V $\alpha$  и/или цепи V $\beta$  TCR соответствуют аминокислотам, присутствующим между остатками номер 56-65, включительно, и последовательности CDR3 внутри цепи V $\alpha$  и/или цепи V $\beta$  TCR соответствуют аминокислотам, присутствующим между остатками номер 105-117, включительно.

**[0293]** В некоторых вариантах осуществления, каждая из цепи  $\alpha$  и цепи  $\beta$  TCR дополнительно содержат константный домен. В некоторых вариантах осуществления, константный домен цепи  $\alpha$  (C $\alpha$ ) и константный домен цепи  $\beta$  (C $\beta$ ) индивидуально представляют собой константный домен млекопитающего, например, человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления, константный домен является соседним с мембраной клетки. Например, в некоторых случаях, внеклеточная часть TCR, сформированная двумя цепями, содержит два ближних к мембране константных домена, и два отдаленных от мембраны переменных домена, где каждый из переменных доменов содержит CDR.

**[0294]** В некоторых вариантах осуществления, каждый из доменов C $\alpha$  и C $\beta$  является человеческим. В некоторых вариантах осуществления, C $\alpha$  кодирован геном TRAC (номенклатура IMGT) или представляет собой его вариант. В некоторых вариантах осуществления, C $\beta$  кодирован генами TRBC1 или TRBC2 (номенклатура IMGT) или представляет собой их вариант. В некоторых вариантах осуществления, любой из представленных TCR или их антигенсвязывающих фрагментов могут представлять собой человеческий/мышинный химерный TCR. В некоторых случаях, TCR или его антигенсвязывающий фрагмент имеют цепь  $\alpha$  и/или цепь  $\beta$ , содержащую мышиную константную область. В некоторых аспектах, области C $\alpha$  и/или C $\beta$  представляют собой мышинные константные области. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, TCR или его антигенсвязывающий фрагмент кодирован нуклеотидной последовательностью, подвергнутой оптимизации по кодонному составу.

**[0295]** В некоторых из любых таких вариантов осуществления, связывающая молекула или TCR, или их антигенсвязывающий фрагмент является выделенным или очищенным, или является рекомбинантным. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, связывающая молекула или TCR, или их антигенсвязывающий фрагмент является человеческим.

**[0296]** В некоторых вариантах осуществления, TCR может представлять собой гетеродимер из двух цепей  $\alpha$  и  $\beta$ , которые являются связанными, например, посредством дисульфидной связи или дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, 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 цепей  $\alpha$  и  $\beta$ , так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах. В некоторых вариантах осуществления, каждый из константных и переменных доменов содержит дисульфидные связи, сформированные остатками цистеина.

**[0297]** В некоторых вариантах осуществления, TCR может представлять собой гетеродимер из двух цепей  $\alpha$  и  $\beta$  (или, необязательно,  $\gamma$  и  $\delta$ ), или он может представлять собой конструкцию одноцепочечного TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (цепи  $\alpha$  и  $\beta$  или цепи  $\gamma$  и  $\delta$ ), которые являются связанными, например, посредством дисульфидной связи или дисульфидных связей.

**[0298]** В некоторых вариантах осуществления, TCR можно получать из известной последовательности(последовательностей) TCR, таких как последовательности цепей  $V\alpha, \beta$ , для которых по существу полноразмерная кодирующая последовательность является легко доступной. Способы получения полноразмерных последовательностей TCR, включая последовательности цепи V, 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.

**[0299]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные рецепторы включают рекомбинантные TCR и/или TCR, клонированные из природных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клон Т-клеток с высокой аффинностью 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.

**[0300]** 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 неопитопу 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.

**[0301]** В некоторых вариантах осуществления, TCR получают из TCR, идентифицированного или отобранного при скрининге библиотеки TCR-кандидатов против полипептидного антигена-мишени, или T-клеточного эпитопа-мишени из него. Библиотеки TCR можно получать посредством амплификации репертуара V $\alpha$  и V $\beta$  из T-клеток, выделенных от субъекта, включая клетки, присутствующие в РВМС, селезенке или другом лимфоидном органе. В некоторых случаях, T-клетки можно амплифицировать из инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL). В некоторых вариантах осуществления, библиотеки TCR можно получать из CD4+ или CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, TCR можно амплифицировать из T-клеточного источника от нормального или здорового субъекта, т.е. библиотеки нормальных TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR можно амплифицировать из T-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 $\alpha$  и V $\beta$ , например, посредством RT-ПЦР, в образцах, таких как T-клетки, полученные от людей. В некоторых вариантах осуществления, библиотеки, такие как библиотеки одноцепочечных TCR (scTv), можно собирать из библиотек наивных V $\alpha$  и V $\beta$ , 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 молекуле TCR.

**[0302]** В некоторых аспектах, TCR подвергают направленной эволюции, например, посредством мутагенеза, например, цепи  $\alpha$  или  $\beta$ . 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 T-клетки, например, посредством скрининга для оценки активности CTL против пептида. В некоторых аспектах, можно отбирать TCR, например, присутствующие на антигенспецифических T-клетках, например, по активности связывания, например, конкретной аффинности или авидности для антигена.

**[0303]** 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 T-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 более остатков CDR мутированы, и отбирают мутанты с желательным измененным свойством, таким как более высокая аффинность для желательного антигена-мишени.

**[0304]** В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой антиген опухоли, который может представлять собой ассоциированный с глиомой антиген, человеческий хорионический  $\beta$ -гонадотропин, альфафетопротеин (AFP), антиген созревания В-клеток (BCMA, BCM), рецептор фактора активации В-клеток (BAFFR, BR3) и/или трансмембранный активатор и партнер CAML (TACI), подобный рецептору Fc белок 5 (FCRL5, FcRH5), реакционноспособный по отношению к лектину AFP, тиреоглобулин, RAGE-1, MN-CA IX, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2 (AS), кишечную карбоксилэстеразу, mut hsp70-2, M-CSF, меланин-A/MART-1, WT-1, S-100, MBP, CD63, MUC1 (например, MUC1-8), p53, Ras, циклин B1, HER-2/neu, карциноэмбриональный антиген (CEA), gp100, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A11, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-C1, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15, тирозиназу, родственной тирозиназе белок 1 (TRP-1), родственной тирозиназе белок 2 (TRP-2),  $\beta$ -катенин, NY-ESO-1, LAGE-1a, PP1, MDM2, MDM4, EGVFvIII, Tax, SSX2, теломеразу, TARP, p65, CDK4, виментин, S100, eIF-4A1, индуцируемый IFN  $\gamma$  p78, и меланотрансферрин (p97), уроплакин II, простатспецифический антиген (PSA), калликреин человека (huK2), простатспецифический мембранный антиген (PSM) и простатическую кислую фосфатазу (PAP), эластазу нейтрофилов, эфрин B2, BA-46, бета-катенин, Vcr-abl, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, каспазу 8 или антиген B-Raf. Другие антигены опухолей могут включать любые антигены, происходящие из FRa, CD24, CD44, CD133, CD 166, epCAM, CA-125, HE4, Oval, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, uPA, PAI-1, CD19, CD20, CD22, ROR1, мезотелина, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, гликолипида F77, GD-2, инсулинового фактора роста (IGF)-I, рецептора IGF-II и IGF-I. Известны специфические опухолеассоциированные антигены или Т-клеточные эпитопы (см., например, van der Bruggen et al. (2013) *Cancer Immun*, доступно на [www.cancerimmunity.org/peptide/](http://www.cancerimmunity.org/peptide/); Cheever et al. (2009) *Clin Cancer Res*, 15, 5323-37).

**[0305]** В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой вирусный антиген. Множество вирусных антигенов-мишеней идентифицированы и известны, включая пептиды, происходящие из вирусных геномов HIV, HTLV и других вирусов (см., например, Addo et al. (2007) *PLoS ONE*, 2, e321 ; Tsomides et al. (1994) *J Exp Med*, 180, 1283-93; Utz et al. (1996) *J Virol*, 70, 843-51 ). Иллюстративные вирусные антигены включают, но без ограничения, антиген из вируса гепатита А, гепатита В (например, поверхностные и коровые антигены HBV (HBV<sub>s</sub>, HBV<sub>s</sub>)), гепатита С (HCV), вируса Эпштейна-Барр (например, EBVA), папилломавируса человека (HPV; например, E6 и E7), вируса иммунодефицита человека типа 1 (HIV1), ассоциированного с саркомой

Капоши вируса герпеса (KSHV), папилломавируса человека (HPV), вируса гриппа, вируса Ласса, HTLN-1, HIN-1, HIN-II, CMN, EBN или HPN. В некоторых вариантах осуществления, белок-мишень представляет собой бактериальный антиген или антиген другого патогена, например, антигены *Mycobacterium tuberculosis* (MT), антигены трипаносомы, например, *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi), такой как поверхностный антиген (TSA), или антигены возбудителя малярии. Известны специфические вирусные антигены или эпитопы, или другие патогенные антигены других патогенов, или Т-клеточные эпитопы (см., например, Addo et al. (2007) PLoS ONE, 2:e321 ; Anikeeva et al. (2009) Clin Immunol, 130:98-109).

**[0306]** В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой антиген, происходящий из вируса, ассоциированного с злокачественной опухолью, такого как онкогенный вирус. Например, онкогенный вирус представляет собой вирус, для которого известно, что инфекция конкретными вирусами приводит к развитию различных типов злокачественных опухолей, например, вирусные инфекции гепатита А, гепатита В (например, коровые и поверхностные антигены HBV (HBV<sub>c</sub>, HBV<sub>s</sub>)), гепатита С (HCV), папилломавируса человека (HPV), гепатита, антиген вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса герпеса человека 8 (HHV-8), вируса-1 Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-1), вируса-2 Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-2) или цитомегаловируса (CMV).

**[0307]** В некоторых вариантах осуществления, вирусный антиген представляет собой антиген HPV, который, в некоторых случаях, может приводить к большему риску развития рака шейки матки. В некоторых вариантах осуществления, антиген может представлять собой антиген HPV-16 и антиген HPV-18, и антиген HPV-31, антиген HPV-33 или антиген HPV-35. В некоторых вариантах осуществления, вирусный антиген представляет собой антиген HPV-16 (например, вызывающие серологическую реакцию области белков E1, E2, E6 и/или E7 HPV-16, см., например, Патент США No. 6531127) или антиген HPV-18 (например, вызывающие серологическую реакцию области белков L1 и/или L2 HPV-18, такие, как описано в Патенте США No. 5840306). В некоторых вариантах осуществления, вирусный антиген представляет собой антиген HPV-16, который происходит из белков E6 и/или E7 HPV-16. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой TCR, нацеленный против E6 HPV-16 или E7 HPV-16. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой TCR, описанный, например, в WO 2015/184228, WO 2015/009604 и WO 2015/009606.

**[0308]** В некоторых вариантах осуществления, вирусный антиген представляет собой антиген HBV или HCV, который, в некоторых случаях, может приводить к большему риску развития рака печени, чем для отрицательных по HBV или HCV субъектов. Например, в некоторых вариантах осуществления, гетерологичный антиген представляет собой антиген HBV, такой как антиген кора вируса гепатита В или антиген оболочки вируса гепатита В (US2012/0308580).

**[0309]** В некоторых вариантах осуществления, вирусный антиген представляет собой антиген EBV, который, в некоторых случаях, может приводить к большему риску

развития лимфомы Беркитта, носоглоточной карциномы и болезни Ходжкина, чем для отрицательных по EBV субъектов. Например, EBV представляет собой вирус герпеса человека, для которого, в некоторых случаях, обнаружены ассоциации с различными опухолями человека, происходящими из разнообразных тканей. В то время как он первоначально был обнаружен как бессимптомная инфекция, положительные по EBV опухоли могут характеризоваться активной экспрессией продуктов вирусных генов, таких как EBNA-1, LMP-1 и LMP-2A. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный антиген представляет собой антиген EBV, который может включать ядерный антиген вируса Эпштейна-Барр (EBNA)-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-лидерный белок (EBNA-LP), латентные мембранные белки LMP-1, LMP-2A и LMP-2B, EBV-EA, EBV-MA или EBV-VCA.

**[0310]** В некоторых вариантах осуществления, вирусный антиген представляет собой антиген HTLV-1 или HTLV-2, который, в некоторых случаях, может приводить к большему риску развития Т-клеточного лейкоза, чем для отрицательных по HTLV-1 или HTLV-2 субъектов. Например, в некоторых вариантах осуществления, гетерологичный антиген представляет собой HTLV-антиген, такой как TAX.

**[0311]** В некоторых вариантах осуществления, вирусный антиген представляет собой антиген HHV-8, который, в некоторых случаях, может приводить к большему риску развития саркомы Капоши, чем для отрицательных по HHV-8 субъектов. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный антиген представляет собой антиген CMV, такой как pp65 или pp64 (см. Патент США No. 8361473).

**[0312]** В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой аутоантиген, такой как антиген из полипептида, ассоциированного с аутоиммунным заболеванием или нарушением. В некоторых вариантах осуществления, аутоиммунное заболевание или нарушение может представлять собой рассеянный склероз (MS), ревматоидный артрит (RA), синдром Шегрена, склеродермию, полимиозит, дерматомиозит, системную красную волчанку, ювенильный ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, миастению (MG), буллезный пемфигоид (антитела против базальной мембраны в дермо-эпидермальном соединении), пемфикус (антитела против мукополисахаридного белкового комплекса или внутриклеточного цементирующего вещества), гломерулонефрит (антитела против базальной мембраны клубочков), синдром Гудпасчера, аутоиммунную гемолитическую анемию (антитела против эритроцитов), болезнь Хашимото (антитела против компонентов щитовидной железы), пернициозную анемию (антитела против внутреннего фактора), идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (антитела против тромбоцитов), болезнь Грэйва или болезнь Аддисона (антитела против тиреоглобулина). В некоторых вариантах осуществления, аутоантиген, такой как аутоантиген, ассоциированный с одним из вышеуказанных аутоиммунных заболеваний, может представлять собой коллаген, такой как коллаген типа II, микобактериальный белок теплового шока, тиреоглобулин, рецептор ацетилхолина (AChR), основной белок миелина (MBP) или протеолипидный белок (PLP). Известны специфические

ассоциированные с аутоиммунитетом эпитопы или антигены (см., например, Bulek et al. (2012) *Nat Immunol*, 13:283-9; Harkiolaki et al. (2009) *Immunity*, 30:348-57; Skowera et al. (2008) *J Clin Invest*, 1(18): 3390-402).

**[0313]** В некоторых вариантах осуществления, пептиды полипептида-мишени для использования для продукции или получения представляющего интерес TCR известны или могут быть легко идентифицированы. 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 доступных компьютерных прогностических моделей. В некоторых примерах, мотивы, связывающие HLA-A0201, и участки расщепления для протеасом и иммунопротеасом, с использованием компьютерных прогностических моделей, известны. В некоторых вариантах осуществления, для прогнозирования участков связывания MHC 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 MHC эпитоп представляет собой HLA-A0201, который является экспрессированным приблизительно у 39-46% из всех европеоидов и таким образом, представляет собой подходящий выбор антигена MHC для использования для получения TCR или другой связывающей MHC-пептид молекулы.

**[0314]** 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 более 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.

**[0315]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный TCR представляет собой полноразмерный TCR. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный TCR представляет собой антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой димерный TCR (dTCR). В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой одноцепочечный TCR (scTCR). В некоторых вариантах осуществления, dTCR или scTCR имеют структуры, как описано, например, в Публикациях международных патентных заявок No. WO 03/020763, WO 04/033685 и WO 2011/044186.

**[0316]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный 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 рекомбинантных 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, рекомбинантный TCR является экспрессированным на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления dTCR или scTCR, содержащих введенные или модифицированные межцепевые дисульфидные связи, природные дисульфидные связи не присутствуют. В некоторых вариантах осуществления, один или более природных остатков цистеина, формирующих природные межцепевые дисульфидные связи, заменены на другой остаток, например, на серин или аланин. В некоторых вариантах осуществления, введенная или модифицированная дисульфидная связь может быть сформирована посредством мутации не относящихся к цистеину остатков в первом и втором фрагментах до цистеина. Иллюстративные неприродные дисульфидные связи TCR описаны в Международной публикации РСТ No. WO2006/000830.

**[0317]** В конкретных вариантах осуществления, TCR содержит одну или более модификацию(модификаций) для введения одного или более остатков цистеина, которые являются способными формировать один или более неприродных дисульфидных мостиков между цепью TCR $\alpha$  и цепью TCR $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит цепь TCR $\alpha$  или ее части, содержащие константный домен TCR $\alpha$ , содержащий один или более остатков цистеина, способных формировать неприродную дисульфидную связь с цепью TCR $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует цепь TCR $\beta$  или ее части, содержащие константный домен TCR $\beta$ , содержащий один или более остатков цистеина, способных формировать неприродную дисульфидную связь с цепью TCR $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит цепь TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ , и/или константные домены цепи TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ , содержащие одну или более модификаций для введения одной или более дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует цепь TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ , и/или TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$  с одной или более модификациями для удаления или предотвращения природной дисульфидной связи, например, между TCR $\alpha$  с трансгена и эндогенной цепью TCR $\beta$ , или между TCR $\beta$  с трансгена и эндогенной цепью TCR  $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления, один или более природных остатков цистеина, которые формируют и/или являются способными формировать природную межцепевую дисульфидную связь, заменяют на другой остаток, например, серин или аланин. В некоторых вариантах осуществления, цистеин вводят в один или более из остатков Thr48, Thr45, Tyr10, Thr45 и Ser15, по отношению к нумерации константного домена TCR $\alpha$ . В конкретных вариантах осуществления, остатки цистеина можно вводить в остаток Ser57, Ser77, Ser17, Asp59 или Glu15 константного домена цепи TCR $\beta$ . Иллюстративные неприродные дисульфидные

связи TCR описаны в Международной публикации PCT No. WO2006/000830, WO 2006/037960 и Kuball et al. (2007) *Blood*, 109:2331-2338.

**[0318]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный TCR представляет собой димерный TCR (dTCR). В некоторых вариантах осуществления, dTCR содержит первый полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области  $\alpha$ -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области  $\alpha$ -цепи TCR, и второй полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области  $\beta$ -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области  $\beta$ -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 более остатков цистеина можно включать в внеклеточные 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.

**[0319]** В некоторых вариантах осуществления, dTCR содержит  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую вариабельный домен  $\alpha$ , константный домен  $\alpha$  и первый мотив для димеризации, присоединенный к C-концу константного домена  $\alpha$ , и  $\beta$ -цепь TCR, содержащую вариабельный домен  $\beta$ , константный домен  $\beta$  и первый мотив для димеризации, присоединенный к C-концу константного домена  $\beta$ , где первый и второй мотивы для димеризации взаимодействуют с образованием ковалентной связи между аминокислотой в первом мотиве для димеризации и аминокислотой во втором мотиве для димеризации, связывая вместе  $\alpha$ -цепь TCR и  $\beta$ -цепь TCR.

**[0320]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный TCR представляет собой одноцепочечный TCR (scTCR или scTv). 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 патентных заявок No. WO 96/13593, WO 96/18105, WO 99/60120, WO 99/18129, WO 03/020763, WO 2011/044186; и Schlueter, C. J. et al. *J. Mol. Biol.* 256, 859 (1996). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит введенную неприродную дисульфидную межцепевую связь для облегчения ассоциации цепей TCR (см., например, Публикацию международной патентной заявки 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 C-концами, облегчают ассоциацию

цепей (см., например, Публикацию международной патентной заявки No. WO 99/60120). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит переменный домен TCR $\alpha$ , ковалентно связанный с переменным доменом TCR $\beta$  посредством пептидного линкера (см., например, Публикацию международной патентной заявки No. WO 99/18129).

**[0321]** В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый фрагмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей переменной области  $\alpha$ -цепи TCR, второй фрагмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей переменной области  $\beta$ -цепи TCR, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константного домена  $\beta$ -цепи TCR, и линкерную последовательность, связывающую C-конец первого фрагмента с N-концом второго фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый фрагмент, состоящий из последовательности переменной области  $\alpha$ -цепи, слитой с N-концом внеклеточной последовательности константного домена  $\alpha$ -цепи, и второй фрагмент, состоящий из последовательности переменной области  $\beta$ -цепи, слитой с N-концом внеклеточной константной последовательности и трансмембранной последовательности  $\beta$ -цепи, и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую C-конец первого фрагмента с N-концом второго фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый фрагмент, состоящий из последовательности переменной области  $\beta$ -цепи TCR, слитой с N-концом внеклеточной последовательности константного домена  $\beta$ -цепи, и второй фрагмент, состоящий из последовательности переменной области  $\alpha$ -цепи, слитой с N-концом внеклеточной константной последовательности и трансмембранной последовательности  $\alpha$ -цепи, и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую C-конец первого фрагмента с N-концом второго фрагмента.

**[0322]** 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 переменных областей ориентированы для такого связывания. Таким образом, в некоторых случаях, линкер имеет достаточную длину для перекрывания расстояния между C-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)<sub>5</sub>-P-, где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин, и S представляет собой серин (SEQ ID NO:22). В некоторых вариантах осуществления, В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет последовательность GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO:23)

**[0323]** В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, связывающую остаток из иммуноглобулиновой области константного домена  $\alpha$ -цепи с остатком из иммуноглобулиновой области константного домена  $\beta$ -цепи. В некоторых вариантах осуществления, межцепевая дисульфидная связь в природном TCR не присутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или более 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.

**[0324]** В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающий фрагмент имеет аффинность с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) 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.

### **III. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК**

**[0325]** В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способам стимуляции, активации, модификации, культивирования и/или размножения одной или более популяций клеток, например, обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, одну или более популяций клеток стимулируют или активируют, например, посредством инкубации клеток в стимулирующих условиях и/или в присутствии стимулирующего реагента. В конкретных вариантах осуществления, одну или более популяций обогащенных Т-клеток подвергают генетической инженерии, например, посредством введения гетерологичного полинуклеотида в клетки из одной или более популяций. В конкретных вариантах осуществления, одну или более популяций обогащенных Т-клеток культивируют, например, культивируют в условиях, стимулирующих или позволяющих деление, рост или размножение Т-клеток, например, в течение фиксированного количества времени, или пока не достигнут порогового предела размножения. В некоторых вариантах осуществления, способ модификации включает стадии стимуляции и затем трансдукции клеток. В конкретных вариантах осуществления, способ модификации включает стадии стимуляции, трансдукции и затем размножения клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки не размножают.

**[0326]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам получения композиции генетически модифицированных Т-клеток из одной или более начальных популяций, например, популяций-источников Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяцию обогащенных Т-клетки инкубируют в стимулирующих условиях, таким образом, получая стимулированную популяцию. В

конкретных вариантах осуществления, гетерологичный полинуклеотид вводят в клетки из стимулированной популяции, таким образом, получая трансформированную популяцию. В конкретных вариантах осуществления, трансформированную популяцию затем размножают, например, в течение установленного количества времени, или пока не достигнут порогового размножения, таким образом, получая размноженную популяцию. В конкретных вариантах осуществления, трансформированную популяцию или размноженную популяцию собирают или накапливают, и необязательно, составляют, например, для введения субъекту или для криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления, популяция представляет собой или содержит CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки.

**[0327]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам получения композиции генетически модифицированных Т-клеток из двух начальных популяций, например, популяций-источников Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, две популяции обогащенных Т-клеток по отдельности инкубируют в стимулирующих условиях, таким образом, получая две отдельные стимулированные популяции. В конкретных вариантах осуществления, гетерологичный полинуклеотид вводят в клетки из двух отдельных стимулированных популяций, таким образом, получая две отдельные трансформированные популяции. В конкретных вариантах осуществления, две отдельные трансформированные популяции затем размножают, например, в течение установленного количества времени, или пока не достигнут порогового размножения, таким образом, получая две отдельные размноженные популяции. В конкретных вариантах осуществления, две отдельные трансформированные популяции или две отдельные размноженные популяции собирают или накапливают, и необязательно, составляют, например, для введения субъекту или для криоконсервирования. В конкретных вариантах осуществления, две отдельные популяции происходят или получены из одного и того же биологического образца или различных биологических образцов от одного и того же индивидуального субъекта. В некоторых вариантах осуществления, две отдельные популяции представляют собой или содержат популяцию обогащенных CD4+ Т-клеток и отдельную популяцию CD8+ Т-клеток.

**[0328]** В некоторых вариантах осуществления, представленные в настоящем описании способы можно использовать для определения, измерения или оценки присутствия, уровня, количества или экспрессии белков, например, поверхностных белков, клеток до, во время или после завершения способа получения модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии получен любым из представленных способов, описанных в настоящем описании, например, в разделе I. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы можно использовать для измерения, мониторинга или оценки эффектов способа модификации на присутствие, отсутствие, количество, уровень и/или относительную распространенность одного или более белков, например, поверхностных белков.

**[0329]** В конкретных вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии получен для клеток из композиции модифицированных клеток. В конкретных вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии получен для клеток, которые собираются подвергать или подвергают способу модификации клеток, например, такому как любой способ модификации, описанный в настоящем описании, например, в разделе-III. В конкретных вариантах осуществления, клетки подвергают любому из способов генетической инженерии, описанных в настоящем описании, например, в разделе-III. В некоторых вариантах осуществления, способ модификации клеток представляет собой или включает стадии получения клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой CAR. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой любой CAR, описанный в настоящем описании, например, в разделе II-C-1-a или II-C-1-b. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой рекомбинантный TCR, например, рекомбинантный TCR, описанный в настоящем описании, например, в разделе II-C-1-c. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой CAR против CD19. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой CAR против ВСМА. В конкретных вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии получен для композиции клеток для измерения или идентификации CAR, экспрессированного модифицированными клетками. В конкретных вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии получен для композиции клеток в ходе способа модификации экспрессирующих CAR клеток.

**[0330]** В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии получают для двух или более композиций клеток, содержащих клетки, собранными на различных стадиях или в различных временных точках способа модификации. В некоторых вариантах осуществления, две или более композиции клеток получают от одного и того же субъекта или субъектов. В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии можно анализировать или сравнивать друг с другом для идентификации эффектов способа модификации на клетки, например, экспрессию поверхностных белков, или в некоторых аспектах, изменения характеристик, свойств или признаков, таких как, но без ограничения, жизнеспособность, дифференцировка или пролиферативный потенциал.

**[0331]** В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии получают для двух или более композиций клеток, содержащих клетки, собранные на одинаковых стадиях или в одинаковых временных точках различных способов модификации, например, различных способов модификации для получения клеток, экспрессирующих одинаковый рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, две или более композиции клеток получают от одного и того же субъекта или субъектов. В конкретных вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии

можно анализировать или сравнивать друг с другом для идентификации эффектов различных способов модификации на клетки.

**[0332]** В некоторых вариантах осуществления, профили масс-спектрометрии для экспрессии такого же рекомбинантного рецептора, например, CAR, полученного в результате различных способов модификации, получают, например, для сравнения или определения эффектов способов модификации на полученные модифицированные клетки. В конкретных вариантах осуществления, производственные процессы отличаются в отношении одной или более стадий или реагентов из процесса. В некоторых вариантах осуществления, процессы отличаются использованием по меньшей мере одного реагента. В некоторых вариантах осуществления, реагент представляет собой стимулирующий реагент, такой как любой стимулирующий реагент, описанный в настоящем описании, например, в разделе III-B. В некоторых вариантах осуществления, реагент может включать антитела, например, антитела против CD3, цитокины, например, IL-2, растворимые антитела против CD3 и/или против CD28, стимулирующие реагенты на основе бусин или олигомерных частиц, или облученные экспрессирующие антиген клетки. В некоторых вариантах осуществления, реагент представляет собой вектор для доставки гена, например, вирусный вектор.

**[0333]** Конкретные варианты осуществления предусматривают, что представленные способы можно также использовать для анализа или характеристики реагентов, которые используют в ассоциации с получения или сохранения композиции модифицированных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, реагенты, такие как любые реагенты, описанные в настоящем описании, например, в разделе-III, могут содержать белки и могут, таким образом, быть исследованы посредством масс-спектрометрии, в соответствии со способами, описанными в настоящем описании.

**[0334]** В некоторых аспектах, изменчивость среди единичных доз композиции клеток может быть обусловлена одним или более аспектами производственных процессов, используемых в получении или изготовлении модифицированного препарата для клеточной терапии. В некоторых случаях, изменения необработанных материалов, или манипуляций с ними или их хранения может влиять на переменные, как наблюдали по настоящему изобретению, влияющие на риск токсичности и/или исходы. В некоторых аспектах, изменчивость между партиями или хранение/манипуляции необработанных материалов и/или использование различных необработанных материалов среди процессов, проведенных среди ряда субъектов, может влиять, например, посредством увеличения изменчивости, или увеличения или уменьшения, конкретных аспектов полученных композиций клеток, таких как аспекты, которые, если меняются, могут приводить к изменчивости риска токсичности или клинических исходов среди субъектов, подвергаемых клеточной терапии, в частности, среди таких субъектов, отличающихся конкретными специфическими для пациента признаками.

**[0335]** В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам, включающим оценку, тестирование и/или контроль потенциального влияния

или изменчивости для одного или более таких признаков продуктов, или рисков, или вероятностей, из-за (например, любого или всех) необработанного материала(материалов), партии(партий), реагента(реагентов) или их хранения, или манипуляции с ними, или их изменения посредством любого из представленных способов. В некоторых вариантах осуществления, такие способы включают анализы, такие как анализы, проводимые перед использованием таких необработанного материала, партии, хранения или манипуляции, в получении композиции клеток для введения субъекту или до такого введения. В некоторых аспектах, анализы оценивают влияние необработанного материала, партии, изменения, или способа манипуляции или хранения, на один или более признаков композиции клеток, таких как признаки, как наблюдали по настоящему изобретению, влияющие на риск токсичности или исход, или усугубляющие влияние изменчивости от пациента к пациенту на такие исходы. В некоторых аспектах, анализы оценивают, присутствует ли приемлемо низкая степень изменчивости или дисперсия, по сравнению с другим материалом, партией, или способом хранения или манипуляции, или приемлемо низкое влияние на такой один или более признаков. В конкретных вариантах осуществления, анализы представляют собой или включают использование масс-спектрометрии, например, любого из способов, представленных в настоящем описании, например, в разделе-I. В конкретных вариантах осуществления, анализы представляют собой или включают получение профилей масс-спектрометрии.

**[0336]** В некоторых аспектах, необработанный материал, партию или способ хранения или манипуляции, выпускают для использования в изготовлении препарата для клеточной терапии, подлежащего введению пациенту - или такой препарат для клеточной терапии вводят пациенту - если, например, только если, или только после того как, анализ, например, анализы, включающие масс-спектрометрию, например, посредством способов, описанных в настоящем описании, подтверждает, что такая изменчивость или дисперсия, или влияние, находится в рамках приемлемого диапазона или значения, или предела. В некоторых вариантах осуществления, определение того, что изменчивость в одном или более из таких признаков составляет ниже определенного уровня при использовании нового необработанного материала или партии, или способа хранения или манипуляции, может ослаблять риск токсичности или уменьшения ответа после осуществления такого нового необработанного материала или партии, или способа хранения или манипуляции. В некоторых вариантах осуществления, среди таких представленных способов присутствуют способы, которыми анализируют композицию до выпуска продукта и/или коррекции способа дозирования на основании таких параметров.

**[0337]** Эти наблюдения согласовывались с интерпретацией, что может обеспечивать преимущества - например, при идентификации безопасной и эффективной дозы композиции клеток - принимать во внимание (например, посредством анализа до выпуска продукта и/или фактора в способе дозирования) степень изменчивости факторов, которые могут вносить вклад в конкретные виды активности клеток/антигенспецифичности в композиции, с точки зрения композиций, полученных из

клеток, происходящих от различных субъектов, и/или в присутствии одного или более различных условий хранения или манипуляций для необработанного материала или реагентов, например, с использованием различных партий реагентов или других необработанных материалов. В некоторых аспектах, обеспечивает преимущества уменьшение изменчивости таких параметров и/или подтверждение приемлемого диапазона изменчивости среди таких различных условий/партий, например, при введении новой партии или реагента, подвергаемых хранению или манипуляции в различных условиях, например, с использованием анализа масс-спектрометрии, как описано в настоящем описании, например, в разделе I.

**[0338]** В некоторых вариантах осуществления, представленные способы, изделия, композиции, дозы и способы дозирования обеспечивают преимущества в том, что для них принимают во внимание и, в соответствующих случаях, регулируют или корректируют, потенциальные источники изменчивости, включая изменчивость, полученную из-за изменения реагентов, и/или изменчивость от пациента к пациенту. Например, в некоторых вариантах осуществления, может обеспечивать преимущества получение модифицированных Т-клеток способом, включающим использование реагента для стимуляции/размножения Т-клеток (или его партии), который, как подтверждено в анализе выпуска, находится ниже или в пределах приемлемого диапазона изменчивости или дисперсии, по сравнению с пороговым уровнем параметра, например, профиля масс-спектрометрии или уровня, количества, концентрации или модификации одного или более белков реагента,

**[0339]** В некоторых вариантах осуществления, реагент представляет собой реагент, который представляет собой или содержит белки. В конкретных вариантах осуществления, реагент используют в ходе способа модификации для стимуляции, активации, трансдукции, трансфекции, трансформации, культивирования или размножения клеток. В некоторых вариантах осуществления, профиль белка представляет собой или представляет собой

#### **А. Выделение или отбор клеток из образцов**

**[0340]** В некоторых вариантах осуществления, стадии переработки включают выделение клеток или их композиций из биологических образцов, таких как биологические образцы, полученные из или происходящие от субъекта, такого как субъект, который имеет конкретное заболевание или состояние, или который нуждается в клеточной терапии, или которого будут подвергать клеточной терапии. В некоторых аспектах, субъект представляет собой человека, нуждающегося в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, перерабатывают и/или модифицируют. 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 ткань, жидкость, и другие образцы, взятые

напрямую от субъекта. Биологический образец может представлять собой образец, полученный напрямую из биологического источника, или образец, который является переработанным. Биологические образцы включают, но без ограничения, образцы жидкостей организма, таких как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, тканей и органов, включая полученные из них переработанные образцы.

**[0341]** В некоторых аспектах, клетки, как правило, представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, и как правило, представляют собой клетки человека. В некоторых вариантах осуществления, клетки происходят из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, представляют собой клетки иммунной системы, такие как клетки врожденного или адаптивного иммунитета, например, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, как правило, Т-клетки и/или клетки NK. Другие иллюстративные клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Клетки, как правило, представляют собой первичные клетки, такие как клетки, выделенные непосредственно от субъекта и/или выделенные от субъекта и замороженные. В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одну или более подгрупп Т-клеток или другие типы клеток, такие как полные популяции Т-клеток, CD4+ клетки, CD8+ клетки и их субпопуляции, такие как субпопуляции, определяемые по функции, состоянию активации, зрелости, потенциалу дифференцировки, размножению, рециркуляции, локализации и/или способности к персистенции, антигенной специфичности, типу рецептора антигена, присутствию в конкретном органе или компартменте, профилю секреции маркера или цитокина, и/или степени дифференцировки. Применительно к субъекту, подлежащему лечению, клетки могут являться аллогенными и/или аутологичными. Среди способов включены способы применения готового к немедленному использованию продукта. В некоторых аспектах, например, для технологий применения готового к немедленному использованию продукта, клетки представляют собой плюрипотентные и/или мультипотентные, например, стволовые клетки, такие как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). В некоторых вариантах осуществления, способы включают выделение клеток от субъекта, их подготовку, переработку, культивирование и/или модификацию, как описано в настоящем описании, и их повторное введение тому же самому пациенту, до или после криоконсервирования.

**[0342]** Среди подтипов и субпопуляций Т-клеток и/или CD4+, и/или CD8+ Т-клеток присутствуют наивные Т (T<sub>N</sub>) клетки, эффекторные Т-клетки (T<sub>ЭФФ</sub>), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T<sub>SCM</sub>), центральные Т-клетки памяти (T<sub>CM</sub>), эффекторные Т-клетки памяти (T<sub>EM</sub>) или терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, инфильтрующие опухоль лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, Т-клетки-помощники, цитотоксические Т-клетки, ассоциированные со слизистыми оболочками инвариантные Т-клетки (MAIT), природные

и адаптивные регуляторные Т-клетки (Т-рег), Т-клетки-помощники, такие как ТН1-клетки, ТН2-клетки, ТН3-клетки, ТН17-клетки, ТН9-клетки, ТН22-клетки, фолликулярные Т-клетки-помощники, альфа/бета-Т-клетки и дельта/гамма-Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой регуляторную Т-клетку (Т-рег). В некоторых вариантах осуществления, клетка дополнительно содержит рекомбинантный FOXP3 или его вариант.

**[0343]** В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой клетки естественные киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

**[0344]** В некоторых вариантах осуществления, получение модифицированных клеток включает одну или более стадий культивирования и/или получения. Клетки для модификации можно выделять из образца, такого как биологический образец, например, образец, полученный или происходящий от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъект, из которого выделяют клетку, представляет собой субъекта, который имеет заболевание или состояние, или который нуждается в клеточной терапии, или которого будут подвергать клеточной терапии. Субъект, в некоторых вариантах осуществления, представляет собой человека, нуждающегося в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, перерабатывают и/или модифицируют.

**[0345]** Соответственно, клетки в некоторых вариантах осуществления представляют собой первичные клетки, например, первичные клетки человека. Образцы включают ткань, жидкость и другие образцы, взятые напрямую от субъекта, так же как образцы, полученные в результате одной или более стадий переработки, таких как разделение, центрифугирование, генетическая инженерия (например, трансдукция вирусным вектором), промывка и/или инкубация. Биологический образец может представлять собой образец, полученный напрямую из биологического источника, или образец, который является переработанным. Биологические образцы включают, но без ограничения, образцы жидкостей организма, таких как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, тканей и органов, включая полученные из них переработанные образцы.

**[0346]** В некоторых аспектах, образец, из которого получают или выделяют клетки, представляет собой кровь или происходящий из крови образец, или представляет собой продукт афереза или лейкоафереза, или происходит из него. Иллюстративные образцы включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию 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, миндалина или другой орган, и/или происходящие из него клетки. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологичных и аллогенных источников.

**[0347]** В некоторых вариантах осуществления, клетки происходят из линий клеток, например, линий Т-клеток. Клетки, в некоторых вариантах осуществления получены из ксеногенного источника, например, из мыши, крысы, нечеловекообразного примата или свиньи.

**[0348]** В некоторых вариантах осуществления, выделение клеток включает одну или более стадий получения и/или не основанного на аффинности разделения клеток. В некоторых примерах, клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или более реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения желательных компонентов, лизиса или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах, клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или более реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения желательных компонентов, лизиса или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам.

**[0349]** 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.

**[0350]** 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.

**[0351]** В некоторых вариантах осуществления, способы получения включают стадии замораживания, например, криоконсервирования, 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. Один пример включает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% человеческого сывороточный альбумин (HSA), или другие подходящие среды для замораживания клеток. Затем это разводят 1:1 средами, так чтобы конечные концентрации DMSO и HSA составляли 10% и 4%, соответственно. Клетки, как правило, затем замораживают до  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1^{\circ}$  в минуту и сохраняют в паровой фазе в сосуде для хранения с жидким азотом.

**[0352]** В некоторых вариантах осуществления, выделение клеток или популяций включает одну или более стадий получения и/или не основанного на аффинности разделения клеток. В некоторых примерах, клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или более 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 более 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 перколла или фиколла.

**[0353]** 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 перколла или фиколла.

**[0354]** В некоторых вариантах осуществления, способы выделения включают разделение различных типов клеток на основании экспрессии или присутствия в клетке одной или более 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, разделение представляет собой разделение на основании аффинности или иммуноаффинности. Например, выделение, в некоторых аспектах, включает разделение клеток и популяций клеток на основании экспрессии или уровня экспрессии в клетках одного или более маркеров, как правило, поверхностных маркеров клеток, например, посредством инкубации с реагентом для отбора, таким как антитело или партнер 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.

**[0355]** 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 более реагентов для отбора, для отбора одного или более различных типов клеток на основании экспрессии или присутствия в или на клетке одной или более специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления, можно 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 более 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 Публикации международной патентной заявки номер WO/2015/164675.

**[0356]** 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 Публикации международной патентной заявки номер WO2009/072003 или US 20110003380 A1. В одном примере, система представляет собой систему, как описано в Международной публикации номер WO2016/073602.

**[0357]** В некоторых вариантах осуществления, посредством проведения таких стадий отбора или их частей (например, инкубации с покрытыми антителами частицами, например, магнитными бусинами) 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.

**[0358]** 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.

**[0359]** 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 к клеткам 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.

**[0360]** 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.

**[0361]** 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.

**[0362]** 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 более

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.

**[0363]** 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 связался 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 колонку для магнитного разделения.

**[0364]** Такие стадии разделения могут быть основаны на положительном отборе, в котором клетки, связавшиеся с реагентами, сохраняют для дальнейшего использования, и/или отрицательном отборе, в котором клетки, не связавшиеся с 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.

**[0365]** В некоторых вариантах осуществления, стадии способа дополнительно включают отрицательный и/или положительный отбор инкубированных клеток, например, с использованием системы или аппарата, 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 более антителами или другими связывающими веществами, которые специфически связываются с одним или более поверхностными маркерами, экспрессированными (маркер<sup>+</sup>) или экспрессированными на относительно более высоком уровне (маркер<sup>высокий</sup>) на положительно или отрицательно отобранных клетках, соответственно.

**[0366]** 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, относятся 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, относятся к уменьшению количества или процента таких клеток, но не должны приводить к полному удалению всех таких клеток.

**[0367]** В некоторых примерах, проводят множество циклов стадий разделения, где положительно или отрицательно отобранную фракцию с одной стадии подвергают другой стадии разделения, такой как последующий положительный или отрицательный отбор. 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, где каждое является специфическим для маркера, подвергаемого нацеливанию для отрицательного отбора. Подобным образом, можно осуществлять одновременный положительный отбор множества типов клеток посредством инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессированных на различных типах клеток.

**[0368]** Например, в некоторых аспектах, специфические субпопуляции Т-клеток, такие как клетки, положительные для или экспрессирующие высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> и/или CD45RO<sup>+</sup> Т-клетки, выделяют посредством способов положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления, такие клетки отбирают посредством инкубации с одним или более антителами или партнерами по связыванию, которые специфически связываются с такими маркерами. В некоторых вариантах осуществления, антитело или партнер по связыванию можно конъюгировать, например, напрямую или опосредованно, с твердой подложкой или матриксом, такими как магнитная бусина или парамагнитная бусина, для обеспечения отбора.

**[0369]** 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 более антителами или другими связывающими веществами, которые специфически связываются с одним или более поверхностными маркерами, экспрессированными (маркер<sup>+</sup>) или экспрессированными на относительно более высоком уровне (маркер<sup>высокий</sup>) на положительно или отрицательно отобранных клетках, соответственно.

**[0370]** В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки отделяют от 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<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> используют для

разделения CD4<sup>+</sup> Т-клеток-помощников и CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток. Такие популяции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> можно далее сортировать на субпопуляции посредством положительного или отрицательного отбора по маркерам, экспрессированным или не экспрессированным в относительно более высокой степени на одной или более субпопуляциях наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток.

**[0371]** В некоторых вариантах осуществления, CD8<sup>+</sup> клетки дополнительно обогащают или истощают по наивным клеткам, центральным клеткам памяти, эффекторным клеткам памяти и/или центральным стволовым клеткам памяти, например, посредством положительного или отрицательного отбора на основании поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления, обогащение по центральным Т-клеткам памяти (T<sub>CM</sub>) 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 T<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup> Т-клеток и CD4<sup>+</sup> Т-клеток дополнительно улучшает эффективность.

**[0372]** В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки памяти присутствуют в обеих CD62L<sup>+</sup> и CD62L<sup>-</sup> подгруппах CD8<sup>+</sup> лимфоцитов периферической крови. РВМС можно обогащать или истощать по CD62L<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> и/или CD62L<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> фракциям, например, с использованием антител против CD8 и против CD62L.

**[0373]** В некоторых вариантах осуществления, обогащение по центральным Т-клеткам памяти (T<sub>CM</sub>) клетки основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD 127; в некоторых аспектах, оно основано на отрицательном отборе клеток, экспрессирующих или высоко экспрессирующих CD45RA и/или гранзим В. В некоторых аспектах, выделение CD8<sup>+</sup> популяции, обогащенной по клеткам T<sub>CM</sub>, 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 (T<sub>CM</sub>) 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, какую используют для получения популяции или субпопуляции CD8<sup>+</sup> клеток, используют также для получения популяции или субпопуляции CD4<sup>+</sup> 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 более дополнительных стадий положительного или отрицательного отбора.

**[0374]** В конкретном примере, образец РВМС 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  $ROR1$ , и положительному отбору на основании маркера, характерного для центральных Т-клеток памяти, такого как  $CD62L$  или  $CCR7$ , где положительный и отрицательный отборы проводят в любом порядке.

**[0375]**  $CD4^+$  Т-клетки-помощники сортируют 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  $CD45RO^-$ ,  $CD45RA^+$   $CD62L^+$   $CD4^+$  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  $CD45RO^-$ .

**[0376]** 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 матриксом, такими 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).

**[0377]** В некоторых аспектах, образец или композицию клеток, подлежащие разделению, инкубируют с реагентом для отбора, например, содержащим небольшой, поддающийся намагничиванию или способный отвечать на магнитное воздействие материал, такой как способные отвечать на магнитное воздействие частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные бусины (например, такие как бусины Dynalbeads или MACS). Способный отвечать на магнитное воздействие материал, например, частица, как правило, напрямую или опосредованно прикреплен к партнеру по связыванию, например, антителу, который специфически связывается с молекулой, например, поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые желательно отделить, например, которые желательно отрицательно или положительно отобрать.

**[0378]** В некоторых вариантах осуществления, магнитная частица или бусина содержит способный отвечать на магнитное воздействие материал, связанный с участником специфического связывания, таким как антитело или другой партнер по

связыванию. Существует множество хорошо известных способов отвечать на магнитное воздействие материалов, используемых в способах магнитного разделения. Пригодные магнитные частицы включают частицы, описанные в Molday, Патент США No. 4452773, и в описании Европейской патентной заявки EP 452342 B, содержание которых, приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Другие примеры представляют собой частицы коллоидного размера, такие как частицы, описанные в Owen, Патент США No. 4795698, и Liberti et al., Патент США No. 5200084.

**[0379]** 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 поверхностными молекулами клетки, если они присутствуют на клетках в образце.

**[0380]** В некоторых аспектах, образец помещают в магнитное поле, и клетки, имеющие связанные с ними способные отвечать на магнитное воздействие или поддающиеся намагничиванию частицы, можно связывать с магнитом и отделять от немеченых клеток. Для положительного отбора, клетки, которые являются связанными с магнитом, сохраняют; для отрицательного отбора, клетки, которые не являются связанными (немеченые клетки), сохраняют. В некоторых аспектах, комбинацию положительного и отрицательного отбора осуществляют в ходе одной и той же стадии отбора, где положительную и отрицательную фракции сохраняют и далее перерабатывают или подвергают дальнейшим стадиям разделения.

**[0381]** В конкретных вариантах осуществления, способные отвечать на магнитное воздействие частицы покрывают 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 более 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.

**[0382]** В некоторых вариантах осуществления, способные отвечать на магнитное воздействие 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, поддающиеся намагничиванию или способные отвечать на магнитное воздействие частицы удаляют от клеток. Способы удаления поддающихся намагничиванию частиц от клеток известны и включают, например, использование

конкурентных немеченых антител, поддающихся намагничиванию частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами и т.д. В некоторых вариантах осуществления, поддающиеся намагничиванию частицы являются биоразлагаемыми.

**[0383]** В некоторых аспектах, разделение осуществляют способом, в котором образец помещают в магнитное поле, и клетки, имеющие связанные с ними способные отвечать на магнитное воздействие или поддающиеся намагничиванию частицы, можно связывать с магнитом и отделять от немеченых клеток. Для положительного отбора, клетки, которые являются связанными с магнитом, сохраняют; для отрицательного отбора, клетки, которые не являются связанными (немеченые клетки), сохраняют. В некоторых аспектах, комбинацию положительного и отрицательного отбора осуществляют в ходе одной и той же стадии отбора, где положительную и отрицательную фракции сохраняют и далее перерабатывают или подвергают дальнейшим стадиям разделения.

**[0384]** 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) 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 этой 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 аспектах, нецелевые клетки метят и истощают из гетерогенной популяции клеток.

**[0385]** В конкретных вариантах осуществления, выделение или разделение проводят с использованием системы, устройства или аппарата, осуществляющего одну или более из стадий способов выделения, получения клеток, разделения, переработки, инкубации, культивирования и/или получения состава. В некоторых аспектах, систему используют для проведения каждой из этих стадий в закрытом или стерильном окружении, например, для минимизации ошибки, манипуляций пользователя и/или контаминации. В одном примере, система представляет собой систему как описано в Международной публикации PCT No. WO2009/072003 или US 20110003380 A1.

**[0386]** В некоторых вариантах осуществления, система или аппарат осуществляет одну или более, например, все, из стадий выделения, переработки, модификации и получения состава в интегрированной или автономной системе, и/или в автоматизированном или программируемом режиме. В некоторых аспектах, система или аппарат включает компьютер и/или компьютерную программу в коммуникации с системой или аппаратом, позволяющими пользователю программировать,

контролировать, оценивать исход и/или корректировать различные аспекты стадий переработки, выделения, модификации и получения состава.

**[0387]** В некоторых аспектах, разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматизированного разделения клеток на уровне клинического масштаба в закрытой и стерильной системе. Компоненты могут включать интегрированный микрокомпьютер, магнитный сепаратор, перистальтический насос, и различные запорные клапаны. Интегрированный компьютер, в некоторых аспектах, контролирует все компоненты устройства и управляет системой для проведения повторных процедур в стандартизированной последовательности. Магнитный сепаратор, в некоторых аспектах, включает подвижный постоянный магнит и держатель для отбирающей колонки. Перистальтический насос контролирует скорость потока через комплект трубок и, вместе с запорными клапанами, обеспечивает контролируемый поток буфера через систему и непрерывную суспензию клеток.

**[0388]** В системе CliniMACS, в некоторых аспектах, используют связанные с антителом поддающиеся намагничиванию частицы, которые поставляют в стерильном, апиrogenном растворе. В некоторых вариантах осуществления, после мечения клеток с использованием магнитных частиц, клетки промывают для удаления избытка частиц. Затем пакет для препарата клеток соединяют с комплектом трубок, который, в свою очередь, соединяют с пакетом, содержащим буфер, и пакетом для сбора клеток. Комплект трубок состоит из предварительно собранных стерильных трубок, включающих предколонку и разделяющую колонку, и предназначен только для однократного использования. После запуска программы разделения, система автоматически наносит образец клеток на разделяющую колонку. Меченные клетки остаются в колонке, в то время как немеченые клетки удаляют посредством серий стадий промывки. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования в способах, описанных в настоящем описании, не являются мечеными и не остаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования в способах, описанных в настоящем описании являются мечеными и остаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования в способах, описанных в настоящем описании, элюируют с колонки после удаления магнитного поля, и собирают в пакет для сбора клеток.

**[0389]** В конкретных вариантах осуществления, разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS Prodigy system (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy, в некоторых аспектах, оборудована единицей для переработки клеток, позволяющей автоматизированную промывку и фракционирование клеток посредством центрифугирования. Система CliniMACS Prodigy может также включать встроенную камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, которое определяет оптимальную конечную точку фракционирования клеток посредством различения макроскопических слоев источника продукта клеток. Например, периферическую кровь

можно автоматически разделять на слои эритроцитов, лейкоцитов и плазмы. Система ClniMACS Prodigy может также включать интегрированную камеру для культивирования клеток, осуществляющую способы культивирования клеток, например, такие как дифференцировка и размножение клеток, нагрузка антигеном и длительное культивирование клеток. Входные отверстия могут позволять стерильное удаление и пополнение сред, и клетки можно мониторировать с использованием интегрированного микроскопа. См., например, Klebanoff et al. (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) *Blood.* 1:72-82, и Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701.

**[0390]** В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток, описанную в настоящем описании, собирают и обогащают (или истощают) посредством проточной цитометрии, при которой клетки, окрашенные по множеству маркеров поверхности клетки, переносят в жидкости. В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток, описанную в настоящем описании, собирают и обогащают (или истощают) посредством сортировки (FACS) в препаративном масштабе. В конкретных вариантах осуществления, популяцию клеток, описанную в настоящем описании, собирают и обогащают (или истощают) с использованием чипов микроэлектромеханических систем (MEMS) в комбинации с системой детекции на основе FACS (см., например, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) *Lab Chip* 10:1567-1573; и Godin et al. (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376). В обоих случаях, клетки можно метить с использованием множества маркеров, позволяющих выделить хорошо определенных подгрупп Т-клеток с высокой чистотой.

**[0391]** В некоторых вариантах осуществления, антитела или партнеры по связыванию метят с использованием одного или более поддающихся детекции маркеров, для облегчения разделения для положительного и/или отрицательного отбора. Например, разделение может быть основано на связывании флуоресцентно меченных антител. В некоторых примерах, разделение клеток на основании связывания антител или других партнеров по связыванию, специфических для одного или более поверхностных маркеров клетки, проводят в потоке жидкости, например, посредством активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS), включая сортировку в препаративном масштабе (FACS) и/или чипы микроэлектромеханических систем (MEMS), например, в комбинации с системой проточно-цитометрической детекции. Такие способы позволяют положительный и отрицательный отбор на основании множества маркеров одновременно.

**[0392]** В некоторых вариантах осуществления, способы получения включают стадии замораживания, например, криоконсервирования, клеток, либо до, либо после выделения, инкубации и/или 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.

Один пример включает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% человеческого сывороточный альбумин (HSA), или других пригодных сред для замораживания клеток. Затем это разводят 1:1 средой, так чтобы конечные концентрации DMSO и HSA составляли 10% и 4%, соответственно. Затем клетки замораживают до  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1^{\circ}$  в минуту и сохраняют в паровой фазе в сосуде для хранения с жидким азотом.

**[0393]** В некоторых вариантах осуществления, антигенспецифические Т-клетки, такие как антигенспецифические CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, получают посредством стимуляции наивных или антигенспецифических Т-лимфоцитов с использованием антигена. Например, можно получать линии или клоны антигенспецифических Т-клеток против цитомегаловирусных антигенов посредством выделения Т-клеток из инфицированных субъектов и стимуляции клеток *in vitro* с использованием такого же антигена.

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

**[0394]** В некоторых вариантах осуществления, одна или более стадий получения включают стадию стимуляции выделенных клеток, таких как отобранные популяции клеток. Инкубацию можно проводить перед или в связи с генетической инженерией, например, перед или в связи с трансдукцией клеток с использованием нуклеиновой кислоты или вектора, кодирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток, например, до трансдукции. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в стимулирующих условиях.

**[0395]** В некоторых вариантах осуществления, представленные способы получения модифицированных клеток включают одну или более из стадий культивирования, инкубации, культивации и/или генетической инженерии. Например, в некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам инкубации и/или модификации истощенных популяций клеток и композиций для начала культивирования. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток инкубируют в композиции для начала культивирования. Инкубацию и/или модификацию можно проводить в культуральном сосуде, таком как единица, камера, лунка, колонка, пробирка, комплект трубок, клапан, флакон, культуральная чашка, пакет или другой контейнер для культивирования или культивации клеток.

**[0396]** В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют и/или культивируют перед или в сочетании с генетической инженерией. Стадии инкубации могут включать культивирование, культивацию, стимуляцию, активацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления, композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего средства. Такие условия включают условия, разработанные для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживаемости клеток в популяции, для имитации

воздействия антигена, и/или для примирования клеток для генетической инженерии, например, для введения рекомбинантного рецептора, например, CAR.

**[0397]** Условия могут включать одно или более 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.

**[0398]** В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия или средства включают одно или более средств, например, лиганд, который является способным активировать внутриклеточный передающий сигналы домен комплекса TCR. В некоторых аспектах, средство запускает или инициирует внутриклеточный каскад передачи сигналов TCR/CD3 в Т-клетке. Такие средства могут включать антитела, такие как антитела, специфические для TCR, например, против CD3. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают одно или более средств, например, лиганд, которые являются способными стимулировать костимулирующий рецептор, например, против CD28. В некоторых вариантах осуществления, такие средства и/или лиганды могут быть связаны с твердой подложкой, такой как бусина, и/или с одним или более цитокинами. Необязательно, способ размножения может дополнительно включать стадию добавления антитела против CD3 и/или против CD28 антитело в культуральную среду (например, в концентрации по меньшей мере приблизительно 0,5 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие средства включают IL-2, IL-15 и/или IL-7. В некоторых аспектах, концентрация IL-2 составляет по меньшей мере приблизительно 10 единиц/мл. В некоторых аспектах, концентрация IL-2 составляет по меньшей мере приблизительно 50 единиц/мл, по меньшей мере приблизительно 100 единиц/мл или по меньшей мере приблизительно 200 единиц/мл.

**[0399]** 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.

**[0400]** В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки стимулируют посредством добавления в композицию для начала культивирования фидерных клеток, таких как неделящиеся моноклеарные клетки периферической крови (РВМС), (например, таким образом, что полученная популяция клеток содержит по меньшей мере приблизительно 5, 10, 20 или 40 или более фидерных клеток РВМС для каждого Т-лимфоцита в исходной популяции, подлежащей размножению); и инкубации культуры (например, в течение времени, достаточного для размножения этих количеств Т-клеток). В некоторых аспектах, неделящиеся фидерные клетки могут содержать гамма-облученные фидерные клетки РВМС. В некоторых вариантах осуществления, РВМС облучают с использованием гамма-излучения в диапазоне от приблизительно 3000 до 3600 рад для предотвращения деления

клеток. В некоторых аспектах, фидерные клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением популяций Т-клеток.

**[0401]** В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют в присутствии экспрессирующих антиген клеток, таких как неделящиеся экспрессирующие антиген клетки. В некоторых случаях, инкубация может дополнительно включать добавление неделящихся трансформированных EBV лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве фидерных клеток. LCL можно облучать с использованием гамма-излучения в диапазоне от приблизительно 6000 до 10000 рад. Фидерные клетки LCL, в некоторых аспектах, предоставляют в любом пригодном количестве, например, в соотношении фидерных клеток LCL к исходным Т-лимфоцитам по меньшей мере приблизительно 10:1.

**[0402]** В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть инкубации в присутствии одного или более стимулирующих условий или стимулирующих средств проводят во внутренней полости камеры для центрифугирования, например, при центрифужном вращении, например, как описано в Международной публикации номер 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, например, отобранные клетки, смешивают с использованием стимулирующего условия или стимулирующего средства в камере для центрифугирования. В некоторых аспектах таких способов, объем клеток объединяют с уровнем одного или более стимулирующих условий или с количеством средств, намного меньшим, чем используют в норме при проведении сходных стимуляций в культуральном планшете или другой системе.

**[0403]** В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство 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 стимулирующего средства, 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 инкубации к клеткам и стимулирующего средства для достижения целевого объема с использованием реагента для инкубации, 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 инкубации и стимулирующее средство предварительно смешивают до добавления 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.

**[0404]** 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.

**[0405]** В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность 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 по меньшей мере приблизительно 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов или 72 часа. В некоторых вариантах осуществления, присутствует дополнительная инкубация в течение периода времени между или между приблизительно 1 часом и 48 часами, 4 часами и 36 часами, 8 часами и 30 часами или 12 часами и 24 часами, включительно.

**[0406]** В конкретных вариантах осуществления, стимулирующие условия включают инкубацию, культивирование и/или культивацию клеток с стимулирующим реагентом. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит или включает бусину. В конкретных вариантах осуществления, инициация стимуляции происходит, когда клетки инкубируют или приводят в контакт со стимулирующим реагентом. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит или включает олигомерный реагент, например, олигомер мутеина стрептавидина. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент активирует и/или является способным активировать один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одного или более компонентов комплекса TCR, и/или один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одной или более костимулирующих молекул.

**[0407]** В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия или стимулирующие реагенты включают одно или более средств, например, лиганд, который является способным активировать внутриклеточный передающий сигналы домен из комплекса TCR. В некоторых вариантах осуществления, средство, как предусмотрено в

настоящем описании, может включать, но без ограничения, РНК, ДНК, белки (например, ферменты), антигены, поликлональные антитела, моноклональные антитела, фрагменты антитела, углеводы, липиды, лектины или любую другую биомолекулу с аффинностью для желательной мишени. В некоторых вариантах осуществления, желательная мишень представляет собой Т-клеточный рецептор и/или компонент Т-клеточного рецептора. В конкретных вариантах осуществления, желательная мишень представляет собой CD3. В конкретном варианте осуществления, желательная мишень представляет собой костимулирующую молекулу Т-клетки, например, CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. Одно или более средств можно присоединять напрямую или опосредованно к бусине посредством множества способов, известных и доступных в данной области. Соединение может являться ковалентным, нековалентным, электростатическим или гидрофобным, и его можно осуществлять посредством множества способов присоединения, включая например, химические способы, механические способы или ферментные способы. В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab. В некоторых вариантах осуществления, биомолекулу (например, биотинилированное антитело против CD3) можно присоединять опосредованно к бусине посредством другой биомолекулы (например, антитела против биотина), напрямую присоединенной к бусине.

**[0408]** В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит одно или более средств (например, антитело), присоединенных к бусине (например, парамагнитной бусине) и специфически связывает одну или более из следующих макромолекул на клетке (например, Т-клетке): CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-1), CD127, MHC1, MHCII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1), CD62L (L-селектин), CD29/CD49d (VLA-4), лиганд Notch (например, дельта-подобный 1/4, Jagged 1/2 и т.д.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 и CXCR3 или их фрагмент, включая соответствующие лиганды для макромолекул или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, средство (например, антитело), присоединенное к бусине, специфически связывает одну или более из следующих макромолекул на клетке (например, Т-клетке): CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO.

**[0409]** В некоторых вариантах осуществления, одно или более средств, присоединенных к бусине, представляет собой антитело. Антитело может включать поликлональное антитело, моноклональное антитело (включая полноразмерные антитела, имеющие область Fc иммуноглобулина), композиции антител с полиэпитопной специфичностью, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, диатела и одноцепочечные молекулы, так же как фрагменты антител (например, Fab, F(ab')<sub>2</sub> и Fv). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент представляет собой фрагмент антитела (включая антигенсвязывающ фрагмент), например,

фрагмент Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')<sub>2</sub>. Понятно, что константные области любого изотипа можно использовать для антител, предусмотренных в настоящем описании, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области можно получать из любых видов человека или животного (например, видов мышей). В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой антитело, которое связывает и/или узнает один или более компонентов Т-клеточного рецептора. В конкретных вариантах осуществления, средство представляет собой антитело против CD3. В конкретных вариантах осуществления, средство представляет собой антитело, которое связывает и/или узнает корецептор. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит антитело против CD28.

**[0410]** В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит частицу, например, бусину, которая является конъюгированной или связанной с одним или более средствами, например, биомолекулами, которые являются способными к активации и/или размножению клеток, например, Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, одно или более средств являются связанными с бусиной. В некоторых вариантах осуществления, бусина является биосовместимой, т.е., состоит из материала, пригодного для биологического применения. В некоторых вариантах осуществления, бусины являются нетоксичными для культивированных клеток, например, культивированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, бусины могут представлять собой любые частицы, способные к присоединению средств способом, позволяющим взаимодействие между средством и клеткой.

**[0411]** В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит бусину и одно или более средств, напрямую взаимодействующих с макромолекулой на поверхности клетки. В конкретных вариантах осуществления, бусина (например, парамагнитная бусина) взаимодействует с клеткой посредством одного или более средств (например, антитела), специфических для одной или более макромолекул на клетке (например, одного или более белков поверхности клеток). В конкретных вариантах осуществления, бусину (например, парамагнитную бусину) метят первым средством, описанным в настоящем описании, таким как первичное антитело (например, антитело против биотина) или другая биомолекула, и затем добавляют второе средство, такое как вторичное антитело (например, биотинилированное антитело против CD3) или другая вторая биомолекула (например, стрептавидин), в результате чего вторичное антитело или другая вторая биомолекула специфически связывается с такими первичными антителами или другой биомолекулой на частице.

**[0412]** В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит одно или более средств, присоединенных к бусине, содержащей кор из оксида металла (например, внутренний кор из оксида железа) и оболочку (например, защитную оболочку), где оболочка содержит полистирол. В конкретных вариантах осуществления, бусины представляют собой монодисперсные, парамагнитные (например, суперпарамагнитные) бусины, содержащие парамагнитный (например,

суперпарамагнитный) железный кор, например, кор, содержащий магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) и/или маггемит ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), и полистирольную оболочку или покрытие. В некоторых вариантах осуществления, бусина является непористой. В некоторых вариантах осуществления, бусины содержат функционализированную поверхность, к которой присоединены одно или более средств. В конкретных вариантах осуществления, одно или более средств являются ковалентно связанными с бусинами на поверхности. В некоторых вариантах осуществления, одно или более средств включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, одно или более средств включают антитело против CD3 и антитело против CD28. В некоторых вариантах осуществления, одно или более средств включают антитело против CD3 и/или антитело против CD28, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с меченым антителом (например, биотинилированное антитело), таким как меченое антитело против CD3 или против CD28. В конкретных вариантах осуществления, бусины имеют плотность приблизительно  $1,5 \text{ г/см}^3$  и площадь поверхности от приблизительно  $1 \text{ м}^2/\text{г}$  до приблизительно  $4 \text{ м}^2/\text{г}$ . В конкретных вариантах осуществления, бусины представляют собой моодисперсные суперпарамагнитные бусины, имеющие диаметр приблизительно  $4,5 \text{ мкм}$  и плотность приблизительно  $1,5 \text{ г/см}^3$ . В некоторых вариантах осуществления, бусины представляют собой моодисперсные суперпарамагнитные бусины, имеющие средний диаметр приблизительно  $2,8 \text{ мкм}$  и плотность приблизительно  $1,3 \text{ г/см}^3$ .

**[0413]** В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит олигомерный реагент, например, реагент на основе мутеина стрептавидина, который является конъюгированным, связанным или присоединенным к одному или более средствам, например, лиганд, который является способным активировать внутриклеточный передающий сигналы домен из комплекса TCR. В некоторых вариантах осуществления, одно или более средств имеют присоединенный связывающий домен или партнер по связыванию (например, партнер по связыванию C), который является способным связывать олигомерный реагент в конкретных участках связывания (например, участок связывания Z). В некоторых вариантах осуществления, множество средств обратимо связывают олигомерный реагент. В различных вариантах осуществления, олигомерный реагент имеет множество конкретных участков связывания, которые, в конкретных вариантах осуществления, обратимо связываются со множеством средств в связывающем домене (например, партнер по связыванию C). В некоторых вариантах осуществления, количество связанных средств уменьшено или снижено в присутствии конкурентного реагента, например, реагент, который также является способным связываться с конкретными участками связывания (например, участок связывания Z).

**[0414]** В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент представляет собой или включает обратимые системы, в которых по меньшей мере одно средство (например, средство, способное подавать сигнал в клетке, такой как Т-клетка) является ассоциированным, например, обратимо ассоциированным, с олигомерным реагентом. В некоторых вариантах осуществления, реагент содержит множество участков

связывания, способных к связыванию, например, обратимому связыванию, со средством. В некоторых случаях, реагент представляет собой реагент из олигомерных частиц, имеющий по меньшей мере одно присоединенное к нему средство способное подавать сигнал в клетке, такой как Т-клетка. В некоторых вариантах осуществления, средство содержит по меньшей мере один участок связывания, например, участок связывания В, который может специфически связывать эпитоп или область молекулы, а также содержит партнера по связыванию, также обозначенный в настоящем описании как партнер по связыванию С, который специфически связывает по меньшей мере один участок связывания реагента, например, участок связывания Z реагента. В некоторых вариантах осуществления, взаимодействие связывания между партнером по связыванию С и по меньшей мере одним участком связывания Z представляет собой нековалентное взаимодействие. В некоторых случаях, взаимодействие связывания между партнером по связыванию С и по меньшей мере одним участком связывания Z представляет собой ковалентное взаимодействие. В некоторых вариантах осуществления, взаимодействие связывания, такое как нековалентное взаимодействие, между партнером по связыванию С и по меньшей мере одним участком связывания Z, является необратимым.

**[0415]** Вещества, которые можно использовать в качестве олигомерных реагентов в таких обратимых системах, известны, см., например, Патенты США No. 5168049; 5506121; 6103493; 7776562; 7981632; 8298782; 8735540; 9023604; и Международные публикации заявок PCT No. WO2013/124474 и WO2014/076277. Неограничивающие примеры реагентов и партнеров по связыванию, способных образовывать обратимое взаимодействие, так же как вещества (например, конкурентные реагенты), способные обращать такое связывание, описаны.

**[0416]** В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент представляет собой реагент из олигомерных частиц, состоящий из и/или содержащий множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В конкретных вариантах осуществления, реагент из олигомерных частиц, представленный в настоящем описании, содержит множество участков связывания, которые обратимо связываются или являются способными к обратимому связыванию с одним или более средствами, например, со стимулирующим средством и/или средством для отбора. В некоторых вариантах осуществления, олигомерная частица имеет радиус, например, средний радиус, между 80 нм и 120 нм, включительно; молекулярную массу, например, среднюю молекулярную массу, между  $7,5 \times 10^6$  г/моль и  $2 \times 10^8$  г/моль, включительно; и/или количество, например, среднее количество, между 500 и 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, включительно. В некоторых вариантах осуществления, реагент из олигомерных частиц связывается, например, обратимо связывается, с одним или более средствами, такими как средство, связывающее молекулу, например, рецептор, на поверхности клетки. В конкретных вариантах осуществления, одно или более средств представляют собой средства, описанные в настоящем описании, например, в разделе II-C-3. В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой Fab против CD3

и/или против CD28, такой как Fab, который содержит партнер по связыванию, например, связывающий стрептавидин пептид, например, Strep-tag® II. В конкретных вариантах осуществления, одно или более средств представляет собой представляет собой Fab против CD3 и/или против CD28, содержащий партнер по связыванию, например, связывающий стрептавидин пептид, например, Strep-tag® II.

### **С. Способы введения гетерологического полинуклеотида**

[0417] В некоторых вариантах осуществления, стадии переработки включают введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок. Различные способы введения генетически модифицированных компонентов, например, рекомбинантных рецепторов, например, CAR или TCR, хорошо известны и могут быть использованы с представленными способами и композициями. Иллюстративные способы включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды или рецепторы, включая перенос посредством вирусных векторов, например, ретровирусных или лентивирусных, невирусных векторов или транспозонов, например, систему транспозона Sleeping Beauty транспозон. Способы переноса генов могут включать трансдукцию, электропорацию или другой способ, приводящий в результате к переносу гена в клетку.

[0418] В некоторых вариантах осуществления, перенос гена осуществляют посредством сначала стимуляции клетки, например, посредством ее объединения со стимулом, который индуцирует ответ, такой как пролиферация, выживаемость и/или активация, например, как измерено посредством экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток, и размножением в культуре до количеств, достаточных для клинических применений.

[0419] В некоторых контекстах, могут являться желательными меры предосторожности против потенциала того, что сверхэкспрессия стимулирующего фактора (например, лимфокина или цитокина) может потенциально приводить к нежелательному исходу или более низкой эффективности у субъекта, например, фактора ассоциированного с токсичностью у субъекта. Таким образом, в некоторых контекстах, модифицированные клетки включают фрагменты генов, которые делают клетки чувствительными к отрицательному отбору *in vivo*, например, при введении в адоптивной иммунотерапии. Например, в некоторых аспектах, клетки модифицируют таким образом, что их можно уничтожать в результате изменения состояния *in vivo* пациента, которому их вводят. Поддающийся отрицательному отбору фенотип может возникать в результате вставки гена, придающего чувствительность к введенному средству, например, соединению. Поддающиеся отрицательному отбору гены включают ген тимидинкиназы вируса простого герпеса типа I (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell 2:223, 1977), придающий чувствительность к ганцикловиру; ген клеточной гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT), ген клеточной аденин-фосфорибозилтрансферазы (APRT), ген бактериальной цитозиндезаминазы (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)).

**[0420]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, например, таких как векторы, происходящие из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусы, аденоассоциированный вирус (AAV). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (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).

**[0421]** 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). Большинство ретровирусных векторов происходят из мышиных ретровирусов. 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 одном варианте 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).

**[0422]** 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.

**[0423]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством электропорации (см., например, Chicaubam et al, (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки 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. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)).

**[0424]** 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.

**[0425]** В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, Т-клетки, можно трансфицировать либо во время, либо после размножения, например, с использованием нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный рецептор, например, Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный рецептор антигена (CAR). Эту трансфекцию для введения гена желательного полипептида или рецептора можно проводить, например, с использованием любого пригодного ретровирусного вектора. Генетически модифицированную популяцию клеток можно затем освободить от исходного стимула (например, стимула CD3/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).

**[0426]** 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.

**[0427]** 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 публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 от Lupton et al., 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.

**[0428]** Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют и/или культивируют перед или в сочетании с генетической инженерией. Стадии инкубации могут включать культивирование, культивацию, стимуляцию, активацию, размножение и/или замораживание для консервирования, например, криоконсервирование.

**[0429]** В некоторых вариантах осуществления, введение проводят посредством приведения одной или более 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 Международной публикации номер 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 Публикации патентной заявки США, No. публикации: US 2008/0171951, и Публикации международной патентной заявки, no. публикации 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.

**[0430]** В некоторых вариантах осуществления, в систему включают и/или систему помещают во взаимодействие с другим оборудованием, включая оборудование для выполнения, автоматизации, контроля и/или мониторинга аспектов стадии трансдукции и одной или более различных других стадий переработки, осуществляемых в системе, например, одной или более стадий переработки, которые можно проводить с или в сочетании с системой камеры для центрифугирования, как описано в настоящем описании или в Международной публикации номер 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. Иллюстративное устройство описано в Патенте США No. 6123655, Патенте США No. 6733433 и US 2008/0171951.

**[0431]** 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 более 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 более 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 более положениях в системе, например, в положении, соответствующем линии входа, линии разведения, линии промывки, линии отходов и/или линии выхода.

**[0432]** 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 более из других стадий переработки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, одну или более 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.

**[0433]** В некоторых вариантах осуществления, композицию, содержащую клетки, вирусные частицы и реагент, можно подвергать вращению, 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). В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляют при ускорении, например, относительно 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).

**[0434]** В некоторых вариантах осуществления, в ходе по меньшей мере части генетической инженерии, например, трансдукции, и/или после генетической инженерии, клетки переносят в контейнер, такой как пакет для культивирования генетически модифицированных клеток, например, для культивирования или размножения клеток, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления, контейнер для культивирования или размножения клеток представляет собой пакет для биореактора, такой как пакет для перфузии.

### **1. Нуклеиновые кислоты и векторы**

**[0435]** В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одну или более нуклеиновых кислот, введенных посредством генетической инженерии, и таким образом, экспрессируют рекомбинантные или генетически модифицированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е., в норме не присутствующими в клетке или образце, полученном из клетки, такими как полученные из другого организма или клетки, которые, например, обычно не обнаруживают в клетке, подвергаемой модификации, и/или в организме, из которого происходит такая клетка. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты являются неприродными, такими как нуклеиновая кислота, не обнаруживаемая в природе, включая нуклеиновую кислоту, содержащую химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из множества различных типов клеток.

**[0436]** В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные рецепторы кодированы одним или более полинуклеотидами (например, молекулами нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые используют в адоптивной клеточной терапии, модифицируют с использованием векторов для генетической инженерии.

**[0437]** В некоторых аспектах, полинуклеотид содержит одну кодирующую последовательность. В других случаях, полинуклеотид содержит по меньшей мере две различных кодирующих последовательности. В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор антигена (CAR). В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит Т-клеточный рецептор (TCR), например, трансгенный TCR. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды и векторы используют для экспрессии в клетках рекомбинантного рецептора.

**[0438]** В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. 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 рецептор, например, химерный рецептор антигена (CAR) содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Неограничивающие иллюстративные примеры сигнальных пептидов включают, например, сигнальный пептид альфа-цепи GMCSFR, указанный в SEQ ID NO: 25 и кодируемый нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:24, или сигнальный пептид CD8-альфа, указанный в SEQ ID NO:26.

**[0439]** В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, содержит по меньшей мере один промотор, который является функционально связанным для контроля экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых примерах, полинуклеотид содержит два, три или более промоторов, функционально связанных для контроля экспрессии рекомбинантного рецептора.

**[0440]** В конкретных случаях, когда молекулы нуклеиновой кислоты кодируют две или более различных полипептидных цепей, каждая из полипептидных цепей может быть кодирована отдельной молекулой нуклеиновой кислоты. Например, представлены две отдельные нуклеиновые кислоты, и каждую можно индивидуально переносить или вводить в клетку для экспрессии в клетке.

**[0441]** В некоторых вариантах осуществления, таких как варианты, в которых полинуклеотид содержит первую и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, 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, транскрипционные единицы могут являться модифицированными в форме бицистронной единицы, содержащей IRES (внутренний участок связывания рибосомы), что позволяет совместную экспрессию продуктов генов ((например, кодирующих поверхностный маркер клетки или его модифицированную форму и кодирующих рекомбинантный рецептор) 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 поверхностный маркер клетки и кодирующий 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 *Thosea asigna* (T2A, например, SEQ ID NO: 6 или 17) и тешовируса-1 свиней (P2A, например, SEQ ID NO: 18 или 19), как описано в Публикации Патента США No. 20070116690.

**[0442]** В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая поверхностный маркер клетки, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, 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, который вызывает проскальзывание рибосомы, который, необязательно представляет собой T2A, P2A, E2A или F2A. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая поверхностный маркер клетки, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, являются функционально связанными с двумя различными промоторами. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая поверхностный маркер клетки, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, присутствуют или вставлены в различных локализациях в геноме клетки.

**[0443]** В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более маркер(ов). В некоторых вариантах осуществления, один или более маркер(ов) представляет собой маркер трансдукции, суррогатный маркер и/или селективный маркер.

**[0444]** В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой маркер трансдукции или суррогатный маркер. Маркер трансдукции или суррогатный маркер можно использовать для детекции клеток, в которые введен полинуклеотид, например, полинуклеотид, кодирующий 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 рецептором, например, 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 тем же полинуклеотидом, который кодирует рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая 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 последовательность 2A, например, T2A, P2A, E2A или F2A. Гены внешних маркеров можно, в некоторых случаях, использовать в сочетании с модифицированной клеткой, чтобы позволять детекцию или отбор клеток и, в некоторых случаях, также стимулировать самоубийство клетки.

**[0445]** 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 модифицированная форма. 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, или рецептор эпидермального фактора роста (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит 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, и подвергнутые оптимизации кодонного состава 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),  $\beta$ -галактозидазы, хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT),  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS) или их варианты.

**[0446]** 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.

**[0447]** В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, является функционально связанной с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как расщепляемая линкерная последовательность, например, T2A. Например, маркерная, и необязательно, линкерная последовательность, может являться любой, как описано в Публикации PCT No. WO2014031687. Например, маркер может представлять собой укороченный EGFR (tEGFR), необязательно, связанный с линкерной последовательностью, такой как расщепляемая линкерная последовательность T2A. Иллюстративный полипептид для 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.

**[0448]** Любой из рекомбинантных рецепторов, описанных в настоящем описании, может быть кодирован полинуклеотидами, содержащими одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих поверхностный маркер клетки и/или рекомбинантные рецепторы, в любых комбинациях или аранжировках. Например, один, два, три или более полинуклеотидов могут кодировать один, два, три или более различных полипептидов, например, поверхностный маркер клетки и/или рекомбинантные рецепторы. В некоторых вариантах осуществления, один вектор или конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую поверхностный маркер клетки, и отдельный вектор или конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая поверхностный маркер клетки, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, являются функционально связанными с двумя различными промоторами. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, присутствует ниже нуклеиновой кислоты, кодирующей поверхностный маркер клетки.

## ***2. Вирусные векторы и получение вирусных векторов***

**[0449]** В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, вводят в композицию, содержащую культивированные клетки, например, посредством ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

**[0450]** Настоящее изобретение относится также к векторам или конструкциям, содержащим такие нуклеиновые кислоты и/или полинуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления, векторы или конструкции содержат один или более промоторов, функционально связанных с нуклеиновой кислотой, кодирующей рекомбинантный рецептор, для контроля ее экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, промотор является функционально связанным с одной или более молекулами нуклеиновой кислоты или полинуклеотидами. Таким образом, настоящее изобретение относится также к векторам, таким как векторы, содержащие любой из полинуклеотидов, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, вектор включает первый полинуклеотид, кодирующий поверхностный маркер клетки, и второй полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, например, CAR.

**[0451]** В некоторых случаях, вектор представляет собой вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор, например, лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор. Настоящее изобретение относится также к набору или комбинации векторов. В некоторых вариантах осуществления, набор или комбинация векторов содержит первый вектор и второй вектор, где первый вектор содержит первый полинуклеотид, например, первый полинуклеотид, кодирующий поверхностный маркер клетки, и второй вектор содержит второй полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, например, CAR. Настоящее изобретение относится также к композициям, содержащим такой набор или комбинацию векторов. В некоторых вариантах осуществления, набор или комбинацию векторов используют совместно для модификации клеток. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй векторы в наборе вводят одновременно или последовательно, в любом порядке, в клетку для модификации.

**[0452]** В некоторых вариантах осуществления, векторы включают вирусные векторы, например, ретровирусные или лентивирусные, невирусные векторы или транспозоны, например, систему транспозона Sleeping Beauty, векторы, происходящие из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы, ретровирусный вектор, происходящий из вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вирус миелопролиферативной саркомы (MPSV), вирус эмбриональных стволовых клеток мыши (MESV), вирус стволовых клеток мыши (MSCV), вирус, образующий очаги в селезенке (SFFV), или аденоассоциированного вируса (AAV).

**[0453]** Геном вирусного вектора, как правило, конструируют в форме плазмиды, которую можно трансфицировать в упаковывающую или продуцирующую линию клеток. В любом из таких примеров, нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, вставлена или локализована в области вирусного вектора, например, как правило, в не являющейся необходимой области вирусного

генома. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота вставлена в вирусный геном вместо определенных вирусных последовательностей для получения вируса, который является дефектным по репликации.

**[0454]** 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.

**[0455]** В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая плаزمида 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.

**[0456]** 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 более генов, кодирующих вирусные компоненты, в дополнение к одной или более представляющим интерес последовательностям, например, рекомбинантным нуклеиновым кислотам. 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.

**[0457]** В некоторых вариантах осуществления, упаковывающую линию клеток трансфицируют одним или более 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 более плазмидами-помощниками, 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.

**[0458]** 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.

**[0459]** 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), ВНК (ATCC CCL-10) и Cf2Th (ATCC CRL 1430).

**[0460]** 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 более вирусных белков, вместе с геномом вирусного вектора, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичный белок, и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей гликопротеин оболочки.

**[0461]** 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.

**[0462]** 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.

**[0463]** 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 как 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.

**[0464]** 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.

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

**[0465]** В некоторых вариантах осуществления, представленные способы включают одну или более стадий культивирования модифицированных клеток, например, культивирования клеток в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение. В конкретных вариантах осуществления, представленные способы не включают стадии культивирования модифицированных клеток. В конкретных вариантах осуществления, присутствует большее количество модифицированных клеток после завершения процесса, по сравнению с исходной композицией-источником клеток, из которой получены клетки. В различных вариантах осуществления, присутствует меньшее количество модифицированных клеток после завершения процесса, по сравнению с исходной

композицией-источником клеток, из которой получены клетки. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки культивируют в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение, после стадии генетической инженерии, например, введения рекомбинантного полипептида в клетки 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 выходную композицию, содержащую композицию обогащенных Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR).

**[0466]** 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.

**[0467]** 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 более стимулирующих условий или средств, например, для стимуляции культивирования, размножения или пролиферации клеток в ходе инкубации. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее условие представляет собой или включает один или более цитокинов, выбранных из IL-2, IL-7 или IL-15. В некоторых вариантах осуществления, цитокин представляет собой рекомбинантный цитокин. В некоторых вариантах осуществления, концентрация одного или более 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 более 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.

**[0468]** В некоторых аспектах, клетки 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, как правило, по меньшей мере приблизительно 30 градусов, и как правило, точно или приблизительно 37

градусов Цельсия. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют при температуре 25-38 градусов Цельсия, например, 30-37 градусов Цельсия, например, точно или приблизительно 37 градусов Цельсия±2 градусов Цельсия. 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.

**[0469]** В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в условиях для поддержания целевого количества диоксида углерода в культуре клеток. В некоторых аспектах, это обеспечивает оптимальные культивирование, размножение и пролиферацию клеток в ходе роста. В некоторых аспектах, количество диоксида углерода (CO<sub>2</sub>) 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<sub>2</sub>.

**[0470]** В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки размножают посредством добавления в композицию для начала культивирования фидерных клеток, таких как неделящиеся моноклеарные клетки периферической крови (РВМС), (например, таким образом, чтобы полученная популяция клеток содержала по меньшей мере приблизительно 5, 10, 20 или 40 или более фидерных клеток РВМС для каждого Т-лимфоцита в исходной популяции подлежащей размножению); и инкубации культуры (например, в течение времени, достаточного для размножения количеств Т-клеток). В некоторых аспектах, неделящиеся фидерные клетки могут содержать гамма-облученные фидерные клетки РВМС. В некоторых вариантах осуществления, РВМС облучают с использованием гамма-излучения в диапазоне приблизительно от 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах, фидерные клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением популяций Т-клеток.

**[0471]** В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают температуру, пригодную для роста Т-лимфоцитов человека, например, по меньшей мере приблизительно 25 градусов Цельсия, как правило, по меньшей мере приблизительно 30 градусов, и как правило, точно или приблизительно 37 градусов Цельсия. Необязательно, инкубация может дополнительно включать добавление неделящихся трансформированных EBV лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве фидерных клеток. LCL можно облучать с использованием гамма-излучения в диапазоне приблизительно от 6000 до 10000 рад. Фидерные клетки LCL, в некоторых аспектах, предоставляют в любом подходящем количестве, таком как соотношение фидерных клеток LCL и исходных Т-лимфоцитов по меньшей мере приблизительно 10:1.

**[0472]** 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, 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.

**[0473]** 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 более стимулирующих средств, например, один или более 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.

**[0474]** В некоторых вариантах осуществления, клетки размножают или культивируют в присутствии одного или более антиидиотипических антител, таких как антиидиотипическое антитело, которое связывает или узнает рекомбинантный рецептор, экспрессированный модифицированными клетками.

**[0475]** В некоторых вариантах осуществления, после инкубации, контейнер, например, пакет, повторно присоединяют к системе для проведения одной или более 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.

#### **Е. КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ**

**[0476]** В конкретных вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии получают для композиции модифицированных клеток, такой как составленная композиция клеток, например, для клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии получают для композиции клеток для подтверждения того, что по меньшей мере часть профиля масс-спектрометрии попадает в допустимый диапазон, например, не выпадает из пороговой изменчивости или дисперсии. В конкретных вариантах осуществления, профиль масс-спектрометрии получают для композиции клеток для идентификации или подтверждения присутствия рекомбинантного рецептора, экспрессированного клетками из композиции клеток, например, составленной композиции клеток или композиции для клеточной терапии.

**[0477]** В некоторых вариантах осуществления, дозу клеток, содержащую клетки, модифицированные с использованием рекомбинантного рецептора антигена, например, CAR или TCR, предоставляют в форме композиции или состава, таких как фармацевтическая композиция или состав. Такие композиции можно использовать в соответствии с представленными способами, и/или с представленными изделиями или композициями, например, в предотвращении или лечении заболеваний, состояний и нарушений, или в способах детекции, диагностики и прогнозирования.

**[0478]** Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечивать эффективность биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, неприемлемо токсичных для субъекта, которому будут вводить состав.

**[0479]** «Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтическом составе, отличному от активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но без ограничения, буфер, наполнитель, стабилизатор или консервант.

**[0480]** В некоторых аспектах, выбор носителя частично определяется конкретной клеткой или средством, и/или способом введения. Соответственно, существует множество пригодных составов. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Пригодные консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. В некоторых аспектах, используют смесь из двух или более консервантов. Консерванты или их смеси, как правило, присутствуют в количестве от приблизительно 0,0001% до приблизительно 2% по массе от суммарной композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители являются, как правило, нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, и включают, но без ограничения: буферы, такие как фосфат, цитрат и

другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметэтония; хлорид бензалкония, хлорид бензэтония; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (менее приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлом (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

**[0481]** Забуферивающие средства, в некоторых аспектах, включают в композиции. Пригодные забуферивающие средства включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия, и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах, используют смесь из двух или более забуферивающих средств. Забуферивающие средства или их смеси, как правило, присутствуют в количестве от приблизительно 0,001% до приблизительно 4% по массе от суммарной композиции. Способы получения пригодных для введения фармацевтических композиций известны. Иллюстративные способы описаны более подробно, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

**[0482]** Состав или композиция могут также содержать более одного активного ингредиента, которые можно использовать для конкретного признака, заболевания или состояния, подвергаемых предотвращению или лечению с использованием клеток или средств, где соответствующие активности не оказывают неблагоприятного влияния друг на друга. Такие активные ингредиенты подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для намеченной цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно включает другие фармацевтически активные вещества или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические средства, например, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.д. В некоторых вариантах осуществления, средства или клетки вводят в форме соли, например, фармацевтически приемлемой соли. Пригодные фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли включают соли, происходящие из неорганических кислот, таких как соляная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, и органических кислот, таких как виннокаменная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, fumarовая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная и арилсульфоновая кислоты, например, п-толуолсульфоновая кислота.

**[0483]** Фармацевтическая композиция, в некоторых вариантах осуществления, содержит средства или клетки в количествах, эффективных для лечения или предотвращения заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическую или профилактическую эффективность, в некоторых вариантах осуществления, мониторируют посредством периодической оценки подвергаемых лечению субъектов. Для повторяющихся введений в течение нескольких суток или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до желательного подавления симптомов заболевания. Однако, другие режимы дозирования можно использовать и можно определять. Желательную дозу можно доставлять посредством однократного болюсного введения композиции, посредством множества болюсных введений композиции, или посредством введения композиции непрерывной инфузией.

**[0484]** Средства или 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 субтеноново 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 или средства. В некоторых вариантах осуществления, ее вводят посредством множества болюсных введений клеток или средства, например, в течение периода не более чем 3 суток, или посредством введения клеток или средства непрерывной инфузией.

**[0485]** Для предотвращения или лечения заболевания, подходящая доза может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа средства или средств, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли средство или клетки для профилактических или терапевтических целей, предшествующей терапии, клинического анамнеза субъекта и ответа на средство или клетки, и решения лечащего терапевта. Композиции, в некоторых вариантах осуществления, подходящим образом вводят субъекту за один раз или на протяжении серии обработок.

**[0486]** Клетки или средства можно вводить с использованием стандартных способов, составов и/или устройств для введения. Представлены составы и устройства, такие как шприцы и флаконы, для хранения и введения композиций. Применительно к клеткам, введение может являться аутологичным или гетерологичным. Например,

иммунореактивные клетки или предшественники можно получать от одного субъекта и вводить тому же самому субъекту или другому, совместимому субъекту. Полученные из периферической крови иммунореактивные клетки или их потомство (например, полученное *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*) можно вводить посредством локализованной инъекции, включая введение через катетер, системной инъекции, местной инъекции, внутривенной инъекции или парентерального введения. При введении терапевтической композиции (например, фармацевтической композиции, содержащей генетически модифицированные иммунореактивные клетки или средство, которое лечит или смягчает симптомы нейротоксичности), ее, как правило, составляют в единичной дозированной пригодной для инъекции форме (растворе, суспензии, эмульсии).

**[0487]** Составы включают составы для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, внутрилегочного, чрескожного, внутримышечного, интраназального, трансбуккального, подъязычного введения или введения с использованием суппозитория. В некоторых вариантах осуществления, средство или популяции клеток вводят парентерально. Термин «парентеральное», в рамках изобретения, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В некоторых вариантах осуществления, средство или популяции клеток вводят субъекту с использованием периферической системной доставки посредством внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

**[0488]** Композиции, в некоторых вариантах осуществления, представлены в форме стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые можно, в некоторых аспектах, забуферивать до выбранного рН. Жидкие препараты обычно проще получать, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции несколько более удобны для введения, особенно посредством инъекции. Вязкие композиции, с другой стороны, можно составлять в пределах соответствующего диапазона вязкости для обеспечения более длительных периодов контакта со специфическими тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащие, например, воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их пригодные смеси.

**[0489]** Стерильные пригодные для инъекции растворы можно получать посредством включения средства или клеток в растворитель, например, в смеси с пригодным носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, физиологический солевой раствор, глюкоза, декстроза или т.п.

**[0490]** Составы, подлежащие использованию для введения *in vivo*, как правило, являются стерильными. Стерильность можно легко обеспечивать, например, посредством фильтрации через мембраны для стерилизации фильтрацией.

#### IV. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**[0491]** 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.

**[0492]** 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 более». Понятно, что аспекты и варианты, описанные в настоящем описании, включают «состоящие» и/или «в основном состоящие из» аспекты и варианты.

**[0493]** 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 ограничение 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.

**[0494]** 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».

**[0495]** В рамках изобретения, указание на то, что положения нуклеотидов или аминокислот «соответствуют» положениям нуклеотидов или аминокислот в описанной последовательности, таким как указаны в списке последовательностей, относится к положениям нуклеотидов или аминокислот, идентифицированным после выравнивания с описанной последовательностью при максимальной идентичности, с использованием

стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP. Посредством выравнивания последовательностей, соответствующие остатки можно идентифицировать, например, с использованием консервативных и идентичных аминокислотных остатков в качестве руководства. Как правило, для идентификации соответствующих положений, последовательности аминокислот выравнивают таким образом, чтобы получить совпадение наиболее высокого порядка (см., например: *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo et al. (1988) *SIAM J Applied Math* 48: 1073).

**[0496]** 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». Среди векторов присутствуют вирусные векторы, такие как ретровирусные, например, гамма-ретровирусные, и лентивирусные векторы.

**[0497]** Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» использованы взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первичную трансформированную клетку и происходящую из нее потомство, независимо от количества пассажей. Потомство может не являться полностью идентичным по содержанию нуклеиновой кислоты с родительской клеткой, но может содержать мутации. Мутантное потомство, имеющее такую же функцию или биологическую активность, как ту, по которой проводили скрининг или отбор исходной трансформированной клетки, включено в настоящее изобретение.

**[0498]** 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.

**[0499]** 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 детектировано 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.

**[0500]** 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.

**[0501]** 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.

**[0502]** 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.

**[0503]** 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.

**[0504]** 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, водные, неводные или любую их комбинацию.

**[0505]** В рамках изобретения, «субъект» представляет собой млекопитающее, такое как человек или другое животное, и как правило, представляет собой человека.

## **V. ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

**[0506]** Среди представленных вариантов осуществления присутствуют:

1. Способ идентификации профиля масс-спектрометрии (MS) композиции генетически модифицированных клеток, включающий:

(a) определение тестируемого профиля масс-спектрометрии образца из тестируемой композиции модифицированных клеток или ее подгруппы с использованием способа масс-спектрометрии, где указанная тестируемая композиция модифицированных клеток содержит иммунциты, содержащие рекомбинантный рецептор;

(b) сравнение тестируемого профиля масс-спектрометрии с эталонным профилем масс-спектрометрии; и

(c) идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в тестируемом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с эталонным профилем масс-спектрометрии, таким образом, идентификацию профиля масс-спектрометрии композиции клеток, содержащей рекомбинантный рецептор.

2. Способ из варианта осуществления 1, где эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции или представляет собой средний профиль масс-спектров ряда образцов из множества эталонных композиций.

3. Способ из варианта осуществления 1 или пункта 2, где тестируемая композиция модифицированных клеток предназначена для использования в аутологичной клеточной терапии.

4. Способ по любому из вариантов осуществления 1-3, где тестируемую композицию модифицированных клеток получают способом, включающим:

(i) отбор или выделение иммунцитов из образца от субъекта, таким образом, получение композиции-источника, необязательно, где биологический образец представляет собой образец после лейкофереза, образец после афереза или образец цельной крови;

(ii) инкубацию клеток из композиции-источника с стимулирующим реагентом, таким образом, получение стимулированной композиции, где инкубацию, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов;

(iii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, в иммунциты из стимулированной композиции, таким образом, получение трансформированной композиции; и

(iv) культивирование стимулированной композиции при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов, таким образом, получение тестируемой композиции модифицированных клеток, где культивирование, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов.

5. Способ по любому из вариантов осуществления 2-4, где в эталонную композицию или каждую из множества эталонных композиций клеток не вводят молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор.

6. Способ по любому из вариантов осуществления 1-5, где эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции, и эталонная композиция клеток представляет собой композицию-источник клеток, содержащую иммунциты, из которых тестируемая композиция клеток произошла или получена.

7. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, где эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции, где:

тестируемая композиция модифицированных клеток содержит иммунциты, полученные от субъекта, где указанные иммунциты содержат молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор; и

эталонная композиция клеток представляет собой входную композицию, содержащую иммунциты, полученные от субъекта, не содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный рецептор.

8. Способ по любому из вариантов осуществления 1-7, где эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции, и эталонная композиция клеток представляет собой композицию, полученную после, до или во время стадии производственного процесса для получения тестируемой композиции модифицированных клеток.

9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, где тестируемая композиция модифицированных клеток представляет собой образец, полученный от субъекта, которому ранее вводили композицию модифицированных клеток.

10. Способ из варианта осуществления 9, где образец, полученный от субъекта, содержит иммуноциты, модифицированные с использованием рекомбинантного рецептора, необязательно, как детектировано посредством проточной цитометрии или полимеразной цепной реакции (ПЦР).

11. Способ из варианта осуществления 9 или варианта осуществления 10, где образец, полученный от субъекта, представляет собой образец крови или образец опухоли.

12. Способ по любому из вариантов осуществления 9-11, где образец, полученный от субъекта, получен между или между приблизительно 6 и 30 суток, между или между приблизительно 14 и 29 суток, или между или между приблизительно 17 и 22 суток после введения модифицированных клеток субъекту.

13. Способ по любому из вариантов осуществления 9-12, где образец получен от субъекта на время или приблизительно на время того, или непосредственно после того, как пик клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, становится детектируемым в крови субъекта.

14. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, где тестируемая композиция модифицированных клеток содержит клетки, приведенные в контакт со средством для получения зависимой от рекомбинантного рецептора активности, необязательно, где средство представляет собой антиген-мишень, способный к связыванию рекомбинантным рецептором, или представляет собой антиидиотипическое антитело, специфическое для антитела.

15. Способ по любому из вариантов осуществления 2-14, где эталонный профиль масс-спектрометрии представляет собой средний профиль масс-спектров ряда образцов из множества эталонных композиций.

16. Способ из варианта осуществления 15, где каждая из множества эталонных композиций содержит клетки, содержащие рекомбинантный рецептор.

17. Способ из варианта осуществления 15 или варианта осуществления 16, где каждая из множества эталонных композиций получена таким же способом или по существу таким же способом, как композиция модифицированных клеток.

18. Способ оценки способа получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий:

(а) получение среднего профиля масс-спектрометрии образца из множества эталонных композиций модифицированных клеток или его подгруппы, где каждая из множества эталонных композиций содержит рекомбинантный рецептор, полученный таким же способом или по существу таким же способом; и

(b) определение присутствия, отсутствия или уровня дисперсии среднего профиля масс-спектрометрии.

19. Способ из варианта осуществления 18, дополнительно включающий выбор способа получения композиции модифицированных клеток, если дисперсия профиля масс-спектрометрии среди множества эталонных композиций составляет не более чем 40%, не более чем 30%, не более чем 20%, не более чем 10% или не более чем 5%, или

изменяется от такого среднего не более чем на одно стандартное отклонение среди компонентов данных профиля масс-спектрометрии.

20. Способ из варианта осуществления 18 или варианта осуществления 19, где средний профиль масс-спектрометрии образца основан на каждой из множества эталонных модифицированных композиций или ее подгруппы, где каждая из множества эталонных композиций модифицированных клеток выбрана из (1) клеток в эталонной модифицированной композиции, (2) CD3+ клеток в эталонной модифицированной композиции; (3) CD4+ Т-клеток в эталонной модифицированной композиции; (4) CD8+ Т-клеток в эталонной модифицированной композиции; (5) рекомбинантный рецептор+ клеток в эталонной модифицированной композиции; (6) рекомбинантный рецептор+ CD3+ клеток в эталонной модифицированной композиции, (7) рекомбинантный рецептор+ CD8+ клеток в эталонной модифицированной композиции или (8) рекомбинантный рецептор+ CD4+ клеток в эталонной модифицированной композиции.

21. Способ из варианта осуществления 18 или варианта осуществления 19, где каждая из множества эталонных композиций получена способом, включающим:

(i) отбор или выделение иммуноцитов из образца от субъекта, таким образом, получение композиции-источника, необязательно, где биологический образец представляет собой образец после лейкофереза, образец после афереза или образец цельной крови;

(ii) инкубацию клеток из композиции-источника с стимулирующим реагентом, таким образом, получение стимулированной композиции, где инкубацию, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов;

(iii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, в иммуноциты из стимулированной композиции, таким образом, получение трансформированной композиции; и

(iv) культивирование стимулированной композиции при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов, таким образом, получение тестируемой композиции модифицированных клеток, где культивирование, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов.

22. Способ по любому из вариантов осуществления 1-17, где тестируемый профиль масс-спектрометрии и эталонный профиль масс-спектрометрии индивидуально представляет собой пептидный профиль.

23. Способ по любому из вариантов осуществления 1-17 и 22, где эталонный профиль масс-спектрометрии определяют с использованием такого же способа масс-спектрометрии, как тестируемый профиль масс-спектрометрии.

24. Способ характеристики способа получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий:

(a) определение первого профиля масс-спектрометрии образца из первой композиции клеток или ее подгруппы с использованием способа масс-спектрометрии;

(b) определение второго профиля масс-спектрометрии образца из второй композиции клеток или ее подгруппы с использованием способа масс-спектрометрии; и

(c) идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в первом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с вторым профилем масс-спектрометрии,

где первая композиция клеток и вторая композиция клеток содержат композиции на различных стадиях производственного процесса для получения композиции генетически модифицированных клеток.

25. Способ из варианта осуществления 24, где первая и вторая композиции клеток находятся на различных стадиях получения композиции генетически модифицированных клеток и выбраны из:

(i) композиции-источника, содержащей иммуноциты, отобранные или выделенные из биологического образца от субъекта, необязательно, где биологический образец представляет собой образец после лейкофереза, образец после афереза или образец цельной крови;

(ii) стимулированной композиции, содержащей иммуноциты из выбранной композиции, приведенные в контакт с стимулирующим реагентом, необязательно, где приведение в контакт проводили в присутствии одного или более цитокинов;

(iii) трансформированной композиции, содержащей клетки из стимулированной композиции, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный рецептор; и

(iv) культивированной композиции, содержащей клетки из трансформированной композиции, культивированные при или приблизительно при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов, необязательно, где культивирование проводят в присутствии одного или более цитокинов.

26. Способ из варианта осуществления 24 или варианта осуществления 25, где первая композиция клеток представляет собой композицию с предшествующей стадии или предшествующей временной точки производственного процесса, по сравнению с второй композицией клеток.

27. Способ характеристики способа получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий:

(a) определение первого профиля масс-спектрометрии образца из первой композиции клеток или ее подгруппы с использованием способа масс-спектрометрии;

(b) определение второго профиля масс-спектрометрии образца из второй композиции клеток или ее подгруппы с использованием способа масс-спектрометрии; и

(c) идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в первом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с вторым профилем масс-спектрометрии,

где первая композиция клеток и вторая композиция клеток содержат генетически модифицированные клетки, полученные различными способами.

28. Способ из варианта осуществления 27, где различные способы отличаются одним или более из присутствия или концентрации сыворотки; времени в культуре; партии реагента; манипуляций с реагентом или его хранения; присутствия или количества стимулирующего реагента; типа стимулирующего реагента; присутствия или количества одного или более цитокинов; присутствия или количества аминокислот; температуры; источника или типа иммуноцитов композиции-источника; соотношения или процента типов иммуноцитов в композиции-источнике, необязательно, соотношения CD4+/CD8+ клеток; плотности клеток; статической культуры; вращающейся культуры; перфузии; типа вирусного вектора; количества копий вектора; присутствия адъюванта для трансдукции; плотности клеток из композиции-источника при криоконсервировании; степени экспрессии рекомбинантного рецептора; или присутствия соединения для модуляции фенотипа клетки.

29. Способ по любому из вариантов осуществления 24-28, где первый профиль масс-спектрометрии и второй профиль масс-спектрометрии индивидуально представляет собой пептидный профиль.

30. Способ по любому из вариантов осуществления 24-29, где первый профиль масс-спектрометрии и второй профиль масс-спектрометрии определяют с использованием такого же способа масс-спектрометрии.

31. Способ характеристики рекомбинантного рецептора, включающий получение профиля масс-спектрометрии рекомбинантного рецептора, с использованием способа масс-спектрометрии, для образца из тестируемой композиции модифицированных клеток или ее подгруппы, содержащей иммуноциты, экспрессирующие или содержащие рекомбинантный рецептор, где указанный профиль масс-спектрометрии содержит по меньшей мере один компонент данных.

32. Способ из варианта осуществления 31, дополнительно включающий идентификацию одного или более различий по меньшей мере в одном компоненте данных, по сравнению с профилем масс-спектрометрии таких же клеток, но не экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

33. Способ из варианта осуществления 31 или варианта осуществления 32, где тестируемая композиция модифицированных клеток стимулирована в присутствии стимулирующего реагента.

34. Способ по любому из вариантов осуществления 31-33, где композиция модифицированных клеток содержит клетки, приведенные в контакт со средством для получения зависимой от рекомбинантного рецептора активности, необязательно, где средство представляет собой антиген-мишень, способный к связыванию рекомбинантным рецептором, или представляет собой антиидиотипическое антитело, специфическое для антитела.

35. Способ по любому из вариантов осуществления 31-34, дополнительно включающий идентификацию одного или более различий в профиле масс-спектрометрии, по сравнению с масс-спектрометрией такой же композиции модифицированных клеток,

но которая не была стимулирована в присутствии стимулирующего реагента или была стимулирована в присутствии другого стимулирующего реагента.

36. Способ по любому из вариантов осуществления 1-35, где композиция клеток обогащена иммунocyтaми.

37. Способ по любому из вариантов осуществления 1-36, где иммунocyтaы содержат лимфоциты.

38. Способ из варианта осуществления 37, где лимфоциты содержат Т-клетки или клетки естественные киллеры (NK).

39. Способ из варианта осуществления 38, где лимфоциты содержат Т-клетки, и Т-клетки представляют собой CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

40. Способ по любому из вариантов осуществления 1-39, где иммунocyтaы являются человеческими.

41. Способ по любому из вариантов осуществления 4, 21, 25 и 28-40, где иммунocyтaы представляют собой Т-клетки, необязательно CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, и стимулирующий реагент является способным активировать один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одного или более компонентов комплекса TCR, и/или один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одной или более костимулирующих молекул.

42. Способ из варианта осуществления 41, где стимулирующий реагент содержит первичное средство, которое специфически связывает член комплекса TCR, и вторичное средство, которое специфически связывает костимулирующую молекулу Т-клетки.

43. Способ из варианта осуществления 42, где первичное средство специфически связывает CD3 и/или костимулирующую молекулу, выбранную из группы, состоящей из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

44. Способ по любому из вариантов осуществления по любому из вариантов осуществления 4, 21, 25 и 28-43, где стимулирующий реагент содержит антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело против CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент.

45. Способ по любому из вариантов осуществления 42-44, где первичное и вторичное средства присутствуют на поверхности твердой подложки, необязательно, где твердая подложка представляет собой бусину.

46. Способ по любому из вариантов осуществления 42-44, где первичное и вторичное средства присутствуют на поверхности растворимого олигомерного реагента, содержащего стрептавидин или мутеин стрептавидаина.

47. Способ по любому из вариантов осуществления 4, 21, 25 и 28-46, где культивирование проводят в условиях для стимуляции пролиферации и/или размножения модифицированных клеток.

48. Способ по любому из вариантов осуществления 1-47, где образец перерабатывают из тестируемой композиции модифицированных клеток посредством

мечения одного или более поверхностных белков, лизиса клеток и выделения одного или более белков.

49. Способ из варианта осуществления 48, дополнительно включающий расщепление одного или более выделенных белков.

50. Способ оценки поверхностных белков из композиции модифицированных клеток, включающий:

(a) мечение одного или более поверхностных белков, присутствующих на клетках из композиции модифицированных клеток или их подгруппе, где композиция модифицированных клеток содержит клетки, экспрессирующие или содержащие рекомбинантный рецептор, таким образом, получение композиции меченых клеток;

(b) лизис клеток из композиции меченых клеток, таким образом, получение композиции лизированных клеток;

(c) выделение одного или более поверхностных белков из композиции лизированных клеток для получения одного или более выделенных белков; и

(d) подвергание одного или более выделенных белков способу масс-спектрометрии для получения профиля масс-спектрометрии, содержащего один или более компонентов данных.

51. Способ из варианта осуществления 50, при этом, перед (d), дополнительно включающий расщепление одного или более выделенных белков.

52. Способ из варианта осуществления 49 или варианта осуществления 51, где расщепление проводят посредством протеолиза в присутствии одной или более протеаз, способных к разрезанию одной или более пептидных связей.

53. Способ из варианта осуществления 52, где одна или более протеаз представляют собой или содержат трипсин.

54. Способ по любому из вариантов осуществления 48-53, где один или более белков содержат мембранные белки поверхности клеток.

55. Способ по любому из вариантов осуществления 48-54, где лизис клеток включает инкубацию в присутствии детергента.

56. Способ из варианта осуществления 55, где детергент представляет собой неионный детергент.

57. Способ из варианта осуществления 56, где детергент представляет собой или содержит эффективное количество Triton X-100.

58. Способ из варианта осуществления 55, где детергент представляет собой денатурирующий детергент.

59. Способ из варианта осуществления 58, где денатурирующий детергент представляет собой или содержит эффективное количество додецилсульфата натрия (SDS).

60. Способ по любому из вариантов осуществления 55-59, где после лизиса клеток, способ дополнительно включает удаление детергента из лизированной композиции.

61. Способ по любому из вариантов осуществления 48-60, где мечение поверхностных белков включает биотиновое мечение первичных аминов.

62. Способ из варианта осуществления 61, где один или более белков выделяют с использованием реагента, содержащего авидин, стрептавидин, NeutrAvidin™ или CaptAvidin™.

63. Способ по любому из вариантов осуществления 1-62, где способ масс-спектрометрии включает подвержение образца жидкостной хроматографии (LC) с последующей масс-спектрометрией.

64. Способ из варианта осуществления 63, где жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографию (UHPLC) или сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

65. Способ из варианта осуществления 63 или варианта осуществления 64, где жидкостная хроматография представляет собой сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

66. Способ по любому из вариантов осуществления 63-65, где жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию проводят поточным способом.

67. Способ по любому из вариантов осуществления 63-66, где жидкостная хроматография выбрана из нормальнофазовой (NP-), обращеннофазовой (RP) и хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC).

68. Способ по любому из вариантов осуществления 63-67, где масс-спектрометр, осуществляющий масс-спектрометрию, включает один или более из квадрупольного, содержащего ионную ловушку, времяпролетного (TOF) или использующего ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье масс-анализатора.

69. Способ из варианта осуществления 68, где масс-спектрометр включает содержащий ионную ловушку масс-анализатор, представляющий собой трехмерную квадрупольную ионную ловушку, цилиндрическую ионную ловушку, линейную квадрупольную ионную ловушку или масс-анализатор Orbitrap.

70. Способ из варианта осуществления 69, где масс-спектрометр представляет собой квадрупольный масс-спектрометр Orbitrap.

71. Способ по любому из вариантов осуществления 1-70, где компоненты данных выбраны из информации о MS ионов, общей ионной хроматограммы (TIC) или ее части, экстракционной ионной хроматограммы (XIC) или ее части, сигнального пика ионов при пептидной MS, сигнального пика ионов при белковой MS, идентификационной информации пептида, идентификационной информации белка, качественной информации, количественной информации, структурной информации, посттрансляционных модификаций.

72. Способ из варианта осуществления 71, где компонент данных представляет собой XIC или ее часть, где XIC или ее часть основана на одном или более теоретических

или известных значениях  $m/z$  для одного или более пептидных компонентов рекомбинантного рецептора.

73. Способ из варианта осуществления 72, где один или более пептидных компонентов представляет собой протеолитически разрезанный или расщепленный пептидный компонент, необязательно, где протеаза представляет собой трипсин.

74. Способ по любому из вариантов осуществления 1-73, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный рецептор антигена.

75. Способ по любому из вариантов осуществления 1-76, где рекомбинантный рецептор является способным связывать антиген-мишень, ассоциированный с, специфический для и/или экспрессированный на клетке или ткани при заболевании, нарушении или состоянии.

76. Способ из варианта осуществления 75, где заболевание, нарушение или состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, или опухоль или злокачественную опухоль.

77. Способ из варианта осуществления 75 или варианта осуществления 76, где антиген-мишень представляет собой антиген опухоли.

78. Способ по любому из вариантов осуществления 75-77, где антиген-мишень выбран среди интегрина  $\alpha v \beta 6$  (интегрин  $\alpha v \beta 6$ ), 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), укороченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), 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 5D (GPCR5D), 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 $\alpha$ ), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 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, экспрессированных HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

79. Способ по любому из вариантов осуществления 1-78, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не относящийся к TCR рецептор антигена или TCR, или его антигенсвязывающий фрагмент.

80. Способ по любому из вариантов осуществления 1-79, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

81. Способ по любому из вариантов осуществления 1-80, где образец происходит из композиции клеток или ее подгруппы, выбранной из (1) клеток в композиции клеток, (2) CD3+ клеток в композиции клеток; (3) CD4+ Т-клеток в композиции клеток; (4) CD8+ Т-клеток в композиции клеток; (5) рекомбинантный рецептор+ клеток в композиции клеток; (6) рекомбинантный рецептор+ CD3+ клеток в композиции клеток, (7) рекомбинантный рецептор+ CD8+ клеток в композиции клеток, или (8) рекомбинантный рецептор+ CD4+ клеток в композиции клеток, необязательно, где рекомбинантный рецептор представляет собой CAR.

82. Композиция модифицированных клеток, где композиция модифицированных клеток получена способом, в котором профиль масс-спектрометрии, полученный с использованием способа масс-спектропии, образца из композиции модифицированных клеток или ее подгруппы является изменчивым не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5% среди средних профилей масс-спектрометрии множества композиций модифицированных клеток, полученных этим способом, или изменяется от такого среднего не более чем на одно стандартное отклонение среди компонентов данных профиля масс-спектрометрии.

83. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 82, где композиция модифицированных клеток содержит рекомбинантный рецептор.

84. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 82 или варианта осуществления 83, где композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты.

85. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 84, где способ получения композиции модифицированных клеток включает:

(i) отбор или выделение иммуноцитов из образца от субъекта, таким образом, получение композиции-источника, необязательно, где биологический образец представляет собой образец после лейкофереза, образец после афереза или образец цельной крови;

(ii) инкубацию клеток из композиции-источника с стимулирующим реагентом, таким образом, получение стимулированной композиции, где инкубацию, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов;

(iii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, в иммуноциты из стимулированной композиции, таким образом, получение трансформированной композиции; и

(iv) культивирование стимулированной композиции при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов, таким образом, получение тестируемой композиции модифицированных клеток, где культивирование, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов.

86. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 84 или варианта осуществления 85, где композиция клеток обогащена иммуноцитами.

87. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 84-86, где иммуноциты содержат лимфоциты.

88. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 87, где лимфоциты содержат Т-клетки или клетки естественные киллеры (NK).

89. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 88, где лимфоциты содержат Т-клетки, и Т-клетки представляют собой CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

90. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 84-89, где иммуноциты являются человеческими.

91. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 85-90, где иммуноциты представляют собой Т-клетки, необязательно CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, и стимулирующий реагент является способным активировать один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одного или более компонентов комплекса TCR, и/или один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одной или более костимулирующих молекул.

92. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 91, где стимулирующий реагент содержит первичное средство, которое специфически связывает

член комплекса TCR, и вторичное средство, которое специфически связывает костимулирующую молекулу T-клетки.

93. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 92, где первичное средство специфически связывает CD3 и/или костимулирующую молекулу, выбранную из группы, состоящей из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

94. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 85-93, где стимулирующий реагент содержит антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело против CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент.

95. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 92-94, где первичное и вторичное средства присутствуют на поверхности твердой подложки, необязательно, где твердая подложка представляет собой бусину.

96. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 92-95, где первичное и вторичное средства присутствуют на поверхности растворимого олигомерного реагента, содержащего стрептавидин или мутеин стрептавидаина.

97. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 85-96, где культивирование проводят в условиях для стимуляции пролиферации и/или размножения модифицированных клеток.

98. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 82-97, где образец перерабатывают из композиции модифицированных клеток посредством мечения одного или более поверхностных белков, лизиса клеток и выделения одного или более белков.

99. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 98, дополнительно включающая расщепление одного или более выделенных белков.

100. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 98 или варианта осуществления 99, где расщепление проводят посредством протеолиза в присутствии одной или более протеаз, способных к разрезанию одной или более пептидных связей.

101. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 100, где одна или более протеаз представляют собой или содержат трипсин.

102. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 98-101, где один или более белков содержат мембранные белки поверхности клеток.

103. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 98-102, где лизис клеток включает инкубацию в присутствии детергента.

104. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 55, где детергент представляет собой неионный детергент.

105. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 104, где детергент представляет собой или содержит эффективное количество Triton X-100.

106. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 105, где детергент представляет собой денатурирующий детергент.

107. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 106, где денатурирующий детергент представляет собой или содержит эффективное количество додецилсульфата натрия (SDS).

108. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 98-107, где после лизиса клеток, способ дополнительно включает удаление детергента из лизированной композиции.

109. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 98-108, где мечение поверхностных белков включает биотиновое мечение первичных аминов.

110. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 109, где один или более белков выделяют с использованием реагента, содержащего авидин, стрептавидин, NeutrAvidin™ или CaptAvidin™.

111. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 82-110, где способ масс-спектрометрии включает подвергание образца жидкостной хроматографии (LC) с последующей масс-спектрометрией.

112. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 111, где жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографию (UHPLC) или сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

113. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 111 или варианта осуществления 112, где жидкостная хроматография представляет собой сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

114. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 111-113, где жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию проводят поточным способом.

115. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 111-114, где жидкостная хроматография выбрана из нормальнофазовой (NP-), обращеннофазовой (RP) и хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC).

116. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 111-115, где масс-спектрометр, осуществляющий масс-спектрометрию, включает один или более из квадрупольного, содержащего ионную ловушку, времяпролетного (TOF) или использующего ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье масс-анализатора.

117. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 116, где масс-спектрометр включает содержащий ионную ловушку масс-анализатор, представляющий собой трехмерную квадрупольную ионную ловушку, цилиндрическую ионную ловушку, линейную квадрупольную ионную ловушку, или масс-анализатор Orbitrap.

118. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 117, где масс-спектрометр представляет собой квадрупольный масс-спектрометр Orbitrap.

119. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 82-118, где компоненты данных выбраны из информации о MS ионов, общей ионной хроматограммы (TIC) или ее части, экстракционной ионной хроматограммы (XIC) или ее части, сигнального пика ионов при пептидной MS, сигнального пика ионов при белковой MS, идентификационной информации пептида, идентификационной информации белка, качественной информации, количественной информации, структурной информации, посттрансляционных модификаций.

120. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 119, где компонент данных представляет собой XIC или ее часть, где XIC или ее часть основана на одном или более теоретических или известных значениях  $m/z$  для одного или более пептидных компонентов рекомбинантного рецептора.

121. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 120, где один или более пептидных компонентов представляет собой протеолитически разрезанный или расщепленный пептидный компонент, необязательно, где протеаза представляет собой трипсин.

122. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 82-121, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный рецептор антигена.

123. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 82-122, где рекомбинантный рецептор является способным связывать антиген-мишень, ассоциированный с, специфический для и/или экспрессированный на клетке или ткани при заболевании, нарушении или состоянии.

124. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 123, где заболевание, нарушение или состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, или опухоль или злокачественную опухоль.

125. Композиция модифицированных клеток из варианта осуществления 123 или варианта осуществления 124, где антиген-мишень представляет собой антиген опухоли.

126. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 123-125, где антиген-мишень выбран среди интегрина  $\alpha v \beta 6$  (интегрин  $\alpha v \beta 6$ ), 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), укороченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), 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 5D (GPCR5D), 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 B, человеческого лейкоцитарного антигена A1 (HLA-A1), человеческого лейкоцитарного антигена A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), рецептора, 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), c-Met, мышинового 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, экспрессируемых HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

127. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 82-126, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не относящийся к TCR рецептор антигена или TCR, или его антигенсвязывающий фрагмент.

128. Композиция модифицированных клеток по любому из вариантов осуществления 8, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

129. Способ оценки реагента, используемого в способе получения композиции модифицированных клеток, включающий:

(a) сравнение профиля масс-спектрометрии образца из первого реагента с эталонным профилем масс-спектрометрии реагента, где профиль масс-спектрометрии получен с использованием способа масс-спектрометрии; и

(c) идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в тестируемом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с эталонным профилем масс-спектрометрии, таким образом, идентификацию профиля масс-спектрометрии реагента.

130. Способ из варианта осуществления 129, где эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонного реагента или представляет собой средний профиль масс-спектров ряда образцов из множества различных партий реагента.

131. Способ из варианта осуществления 130, где эталонный профиль масс-спектрометрии представляет собой средний профиль масс-спектрометрии образца из множества различных партий реагента.

132. Способ из варианта осуществления 131, дополнительно включающий определение присутствия, отсутствия или уровня дисперсии профиля масс-спектрометрии образца от среднего профиля масс-спектрометрии.

133. Способ из варианта осуществления 132, дополнительно включающий выбор реагента, если дисперсия профиля масс-спектрометрии среди множества различных партий реагента составляет не более чем 40%, не более чем 30%, не более чем 20%, не более чем 10% или не более чем 5%, или изменяется от такого среднего не более чем на одно стандартное отклонение среди компонентов данных профиля масс-спектрометрии.

134. Способ по любому из вариантов осуществления 129-133, где способ масс-спектрометрии включает подвергание образца жидкостной хроматографии (LC) с последующей масс-спектрометрией.

135. Способ из варианта осуществления 134, где жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографию (UHPLC), или сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

136. Способ из варианта осуществления 135 или варианта осуществления 135, где жидкостная хроматография представляет собой сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

137. Способ по любому из вариантов осуществления 134-136, где жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию проводят поточным способом.

138. Способ по любому из вариантов осуществления 134-137, где жидкостная хроматография выбрана из нормальнофазовой (NP-), обращеннофазовой (RP) и хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC).

139. Способ по любому из вариантов осуществления 134-138, где масс-спектрометр, осуществляющий масс-спектрометрию, включает один или более из квадрупольного, содержащего ионную ловушку, времяпролетного (TOF) или

использующего ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье масс-анализатора.

140. Способ из варианта осуществления 139, где масс-спектрометр включает содержащий ионную ловушку масс-анализатор, представляющий собой трехмерную квадрупольную ионную ловушку, цилиндрическую ионную ловушку, линейную квадрупольную ионную ловушку, или масс-анализатор Orbitrap.

141. Способ из варианта осуществления 140, где масс-спектрометр представляет собой квадрупольный масс-спектрометр Orbitrap.

142. Способ по любому из вариантов осуществления 129-410, где компоненты данных выбраны из информации о MS ионов, общей ионной хроматограммы (TIC) или ее части, экстракционной ионной хроматограммы (XIC) или ее части, сигнального пика ионов при пептидной MS, сигнального пика ионов при белковой MS, идентификационной информации пептида, идентификационной информации белка, качественной информации, количественной информации, структурной информации, посттрансляционных модификаций.

143. Способ по любому из вариантов осуществления 129-142, где реагент представляет собой реагент, способный стимулировать сигнал в клетках из композиции клеток, необязательно, композиции T-клеток.

144. Способ из варианта осуществления 143, где клетки из композиции клеток содержат рекомбинантный рецептор, необязательно, химерный рецептор антигена.

145. Способ из варианта осуществления 144, где реагент является способным стимулировать или индуцировать зависимую от рекомбинантного рецептора активность в клетках из композиции клеток.

## **VI. ПРИМЕРЫ**

[0507] Следующие примеры включены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема изобретения.

### **Пример 1: Анализ экспрессии поверхностных белков T-клетками посредством масс-спектрометрии**

[0508] Экспрессию поверхностных белков клетками, собранными до или после иллюстративного способа модификации для получения композиций T-клеток, содержащих экспрессирующие химерные рецепторы антигенов (CAR) T-клетки, анализировали с использованием жидкостной хроматографии-танDEMной масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Исходные композиции-источники T-клеток, обогащенные CD4+ или CD8+ T-клетками, получали из образцов от человека после лейкафереза посредством обогащения на основании иммуноаффинности и подвергали криоаморазиванию. CD4+ или CD8+ T-клетки впоследствии размораживали, активировали с использованием парамагнитных бусин против CD3/против CD28 и трансдуцировали вирусным вектором, кодирующим CAR против CD19, с последующим размножением и криоконсервированием композиций модифицированных клеток. CAR против CD19 содержал scFv против CD19, происходящий из мышиного антитела,

происходящий из Ig спейсер, происходящий из CD28 человека трансмембранный домен, происходящий из 4-1BB человека внутриклеточный передающий сигналы домен и происходящий из CD3-дзета человека передающий сигналы домен.

**[0509]** Анализы LC-MS/MS проводили для образцов пептидов, полученных после выделения белка поверхности клеток из образцов Т-клеток как из исходной композиции-источника, так и из композиции CAR+ модифицированных клеток. Кратко, образцы Т-клеток из криоконсервированных исходной композиции-источника и композиции CAR+ модифицированных клеток, содержащие приблизительно  $15-150 \times 10^6$  клеток, размораживали и промывали. Для мечения поверхностных белков посредством первичных аминов на поверхности интактных клеток, клетки ресуспендировали в растворе сульфо-NHS-SS-биотина, полученного посредством добавления ледяного PBS во флакон с биотином (Pierce; кат. No. 89881). Каждый ресуспендированный образец клеток затем переносили в  $25 \text{ см}^2$  культуральный флакон и дополнительную аликвоту раствора биотина добавляли к каждому образцу. Затем культуральные флаконы инкубировали на качающейся платформе (300 об./мин) при  $4^\circ\text{C}$  в течение 30 минут. Для образцов композиции модифицированных клеток проводили выделение белка поверхности клеток посредством лизиса клеток с использованием мягкого детергента, выделение меченых белков с использованием аффинного реагента на основе агарозы (например, агарозы Thermo Scientific™ NeutrAvidin™) и высвобождение меченых белков с использованием буфера для образцов с додецилсульфатом натрия (SDS) (62,5 мМ Трис•HCl, pH 6,8, 1% SDS, 10% глицерин), содержащего 50 мМ DTT. Для образцов исходной композиции-источника клеток, белки поверхности клеток элюировали с использованием 200 мкл буфера для образцов с додецилсульфатом натрия (SDS).

**[0510]** Затем каждый образец исходной композиции-источника или композиции модифицированных клеток обрабатывали для удаления поверхностно-активных веществ посредством диализа с использованием фильтра с номинальным пределом молекулярной массы (NMWL) 10000, с обменом буфера на 400 мкл буфер UA (8 М мочевины в 0,1 М Трис-HCl, pH 8,3) для восстановления дисульфидных связей, с последующим добавлением 100 мкл 50 мМ иодацетамида для алкилирования свободных тиольных групп на остатках цистеина. После промывки фильтров с использованием 100 мкл 50 мМ бикарбоната аммония/3 М мочевины с последующим центрифугированием несколько раз, образцы собирали. В некоторых случаях, образцы пулировали перед проведением процедуры фильтрации, описанной выше.

**[0511]** Полученные образцы затем подвергали расщеплению трипсином в течение ночи при  $37^\circ\text{C}$ . После инкубации, каждую реакцию расщепления останавливали посредством добавления 10% трифторуксусной кислоты (TFA).

**[0512]** Затем образцы исходной композиции-источника и композиции модифицированных клеток концентрировали по необходимости (на основании исходной оценки распространенности пептидов с использованием жидкостной хроматографии) до анализа масс-спектрометрии). В некоторых случаях, образцы пулировали перед

процедурой концентрирования, описанной выше. Каждый образец анализировали способом tandemной масс-спектрометрии с использованием гибридного квадрупольного масс-спектрометра Orbitrap, соединенного с жидкостным хроматографом. Данные масс-спектрометрии получали с использованием способа зависящего от данных сбора (выбирали 20 наиболее распространенных ионов). Установки масс-спектрометра включали: MS<sup>1</sup> разрешение по массе 120000; MS<sup>1</sup> диапазон сканирования 325-2000 m/z; MS<sup>1</sup> целевое значение AGC 5e5; список включения с точностью 5 м.д.; MS<sup>2</sup> разрешение по массе 30000; MS<sup>2</sup> диапазон сканирования 200-2000 m/z; окно выделения 4 m/z; MS<sup>2</sup> целевое значение AGC 1e5 и энергия фрагментации 22 (NCE).

**[0513]** Наборы данных, полученные из каждого анализа LC-MS/MS, описанного выше, анализировали с использованием программного обеспечения ProteomeDiscover (ThermoScientific v2.1) с использованием базы данных протеома человека, полученной из UNIPROT и общей базы данных побочных белков Repository of Adventitious Proteins, полученной из Global Proteome Machine. Параметры алгоритма поиска включали: триптические пептиды; максимум пропущенных разрезов 2; минимальная длина пептида 6; допуск по массе предшественника 10 м.д.; допуск по массе фрагмента 0,02 Да; динамические модификации для окисления остатков метионина и мечения биотином остатков лизина; статические модификации для карбоксиметилирования остатков цистеина; использование ловушек с FDR 1% или менее; и уровень ложноположительных результатов (FDR) 1% или менее.

**[0514]** Пептиды подтверждали вручную с использованием 5 м.д. экстракционной ионной хроматограммы и визуального характерного паттерна MS<sup>2</sup>.

**[0515]** ФИГ. 1А представляет собой иллюстративное изображение общих ионных хроматограмм (TIC) из анализа LC-MS/MS образца исходной композиции-источника клеток (нижняя половина) и TIC из анализа LC-MS/MS образца соответствующей композиции модифицированных клеток (верхняя половина). Как показано на ФИГ. 1А, наблюдали различия пиков, соответствующие различиям в пептидных ионах белков поверхности клетки между исходной композицией-источником и композицией модифицированных клеток. С использованием способа LC-MS/MS, описанного выше, идентифицировано всего 1406 белков поверхности клеток, включая 397 белков, которые являлись уникальными для композиции-источника клеток, и 223 белков, которые являлись уникальными для композиции модифицированных клеток.

**[0516]** Эти данные согласовывались со способностью анализа LC-MS/MS устанавливать различия между профилями экспрессии поверхностных белков для композиций Т-клеток, собранных на различных стадиях способа генетической инженерии.

**[0517]** Экстракционную ионную хроматограмму (XIC) получали посредством разделения ионов, ассоциированных с CAR против CD19, с использованием теоретических масс триптических пептидов компонентов CAR (с допуском 5 м.д. от теоретического), и сравнивали как в исходной композиции-источнике, так и в модифицированной композиции Т-клеток. На фиг. 1В изображено иллюстративное

объединенное изображение ХИС образца исходной композиции-источника клеток (нижняя половина) и образца соответствующей композиции модифицированных CAR+ клеток (верхняя половина). Идентифицированы пептидные пики, ассоциированные с внеклеточными и внутриклеточными частями CAR, где пики P1 - P19 представляют внеклеточную область. Различия в пиках наблюдали в ХИС, полученных для композиции модифицированных клеток, которая включала экспрессирующие CAR Т-клетки, по сравнению с клетками из исходного источника, которые не содержали экспрессирующие CAR клетки (ФИГ. 1В). Некоторые пики, ассоциированные с CAR против CD19, наблюдали в ХИС, полученной для исходного источника клеток, что согласуется с тем, что компоненты CAR экспрессируются также в качестве части эндогенных белков, например, передающий сигналы домен CD3-дзета.

**Пример 2: Анализ реагентов для способа модификации CAR Т-клеток, посредством масс-спектрометрии**

[0518] Наблюдали, что, в некоторых случаях, изменения условий хранения или манипуляций для необработанного материала(материалов) или реагента(реагентов), или различные партии необработанного материала(материалов) или реагента(реагентов), используемые в способе получения модифицированной композиции Т-клеток - в сходном в ином отношении способе модификации клеток - могут коррелировать, в конечной модифицированной композиции, с конкретными параметрами, ассоциированными с измененной или изменчивой активностью продукта модифицированных Т-клеток.

[0519] Различные партии иллюстративного необработанного материала, которые использованы в способе получения композиции модифицированных CAR+ Т-клеток, и которые идентифицированы в качестве реагента, требующего титрования в процессе, из-за изменчивости между партиями, анализировали посредством LC-MS/MS для оценки присутствия или отсутствия различий между партиями. Необработанный материал, как известно или как подозревают, содержал три различных белка. Образцы реагента отбирали из трех различных производственных партий, каждая из которых соответствовала критериям выпуска поставщика. Белки выделяли из реагента и анализировали посредством LC-MS/MS в способе, сходном с описанным в примере 1.

[0520] Белки разделяли посредством обращеннофазовой хроматографии. Как показано на ФИГ. 2, различные профили наблюдали среди трех различных партий, что согласовывалось с различием в относительных количествах или свойствах белков между партиями. Анализ LC отдельно, однако, показал совместную элюцию нескольких белков. Для установления отличий между белками, совместно элюированными, отношения массы к заряду ( $m/z$ ) предварительно выбирали и детектировали в анализе (ФИГ. 2, левый верхний угол). Как показано на врезке из ФИГ. 2, различные совместно элюированные белки можно было отдельно детектировать, показывая полезность этого способа для идентификации различий среди партий реагентов, содержащих белки, количества или свойства которых (например, посттрансляционная модификация) могут отличаться.

**[0521]** Образцы необработанного реагента на трех различных уровнях дополнительно анализировали по двум из белков, которые, как подозревают, вероятнее всего влияют на способ получения модифицированной композиции Т-клеток. Относительный процент каждого из этих двух белков в каждом из титрованных образцов количественно оценивали. Как показано на ФИГ. 3, анализ компонентов реагента посредством масс-спектрометрии показал, что относительный процент второго белка (плюс посттрансляционные модификации, PTM, второго белка) из реагента обратно коррелировал с относительным процентом третьего белка. Эти результаты согласуются с предполагаемым комбинированным эффектом третьего белка и второго белка в способе модификации CAR-Т-клеток, как показано посредством обратной корреляции их относительных количеств при различных уровнях титрования. Совместно, эти результаты согласуются с использованием масс-спектрометрии, в комбинации со знаниями о биологической значимости белковых компонентов для способа модификации, чтобы способствовать идентификации изменчивости между партиями реагентов и потенциального влияния на производственные процессы.

**Пример 3: Картирование поверхностных N-связанных гликанов композиции клеток**

**[0522]** Для картирования профиля N-связанных гликанов поверхности клеток для композиции клеток, иллюстративные криоконсервированные композиции Т-клеток, содержащие клетки, экспрессирующие химерный рецептор антигена (CAR), индивидуально размораживали, разводили 1:10 в культуральных средах, нагретых до 37°C, и образец из  $1-2,5 \times 10^6$  клеток переносили в новую пробирку.

**[0523]** Перенесенный образец клеток центрифугировали и промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS), с последующим разведением суспензии клеток с использованием приблизительно 198 мкл PBS. Приблизительно 2 мкл PNGазы F PRIME (N-Zyme Scientifics; доступной из Bulldog Bio, каталожный No. NZPP050) добавляли к суспензии клеток, содержащей цельные, интактные клетки, с последующей инкубацией в течение 30 минут при 37°C с осторожным перемешиванием. Для получения высвобожденных поверхностных N-гликанов, суспензию клеток центрифугировали, и супернатант собирали в чистую пробирку, которую немедленно подвергали выпариванию до сухости с использованием вакуумного центрифугирования.

**[0524]** Добавляли 5 мкл реагента для мечения, состоящего из N-гидроксисукцинимидной (NHS) группы мечения карбамата, флуорофора хинолона и основного третичного амина (например, метки Glycoworks™ RapiFluor-MS™). Образец перемешивали, инкубировали в течение приблизительно 5 минут при комнатной температуре, с последующей остановкой мечения посредством добавления приблизительно 365 мкл ацетонитрила к образцу. Образец перемешивали и центрифугировали. Твердофазную экстракцию (SPE) проводили для образца, для дополнительной очистки N-гликанов до дальнейшего анализа. Образец N-гликана

выпаривали до сухости с использованием вакуумной центрифуги и затем ресуспендировали в подходящем разбавителе для анализа.

[0525] Гликаны разделяли с использованием жидкостной хроматографии HILIC и детектировали посредством флуоресценции (Waters ACQUITY I-Class) (HILIC-FLR) и тандемной масс-спектрометрии (положительной ионизации электрораспылением (ESI), Q-Exactive™ HF (Thermo Scientific)), т.е., HILIC-ESI-MS/MS, для относительной количественной оценки и идентификации.

[0526] Как показано на ФИГ. 4А, хроматограмма автоматизированной HILIC-FLR выявила, что карта N-гликанов поверхности клеток для активированных антителами против CD3/против CD28 CD3+ клеток представляла собой сложную смесь типов гликанов.

[0527] Для тандемной масс-спектрометрии (MS/MS), частицы ионизировали посредством ESI и разделяли по их отношение массы к заряду на первой стадии масс-спектрометрии. На ФИГ. 4В показана экстракционная ионная хроматограмма (XIC), полученная на первой стадии масс-спектрометрии для иллюстративного A3S3F N-гликана в+3 заряженном состоянии с использованием допуска по массе 5 м.д. Наблюдали множество хроматографических пиков N-гликана с идентичными распределениями изотопов, что согласуется с вероятным присутствием различий связей между моносахаридными звеньями структуры гликана. После первой стадии, гликаны подвергали фрагментации, и полученные фрагменты разделяли и измеряли на второй стадии MS/MS. MS/MS для фрагментации иллюстративного N-гликана A3S4F, фрагментированного посредством диссоциации при высокоэнергетических столкновениях (HCD) при нормализованной энергии столкновения (NCE) 15, показана на ФИГ. 4С. В сочетании с данными высокоразрешающей MS с первой стадии, фрагментация A3S4F подтвердила присутствие связи n-ацетилнейраминовой кислоты на каноническом концевом остатке галактозы, так же как в уникальном участке остатка n-ацетилглюкозамина тех же самых антенн (ФИГ. 4С, рамки). Эти результаты показывают, что MS/MS, в сочетании с данными высокоразрешающей MS, может идентифицировать гликановые структуры, включая уникальные гликановые структуры, после разделения и детекции посредством HILIC-FLR.

**Пример 4: Идентификация изменений в гликотрансферазах посредством картирования поверхностных N-связанных гликанов**

[0528] Поверхностные N-связанные гликаны из первой и второй композиции клеток выделяют и метят способом, сходным с описанным в примере 3. N-гликаны разделяют с использованием жидкостной хроматографии HILIC и детектируют посредством флуоресценции и масс-спектрометрии посредством HILIC-ESI-MS/MS для относительной количественной оценки и идентификации способом, сходным с описанным в примере 3. Полученные профили N-гликанов для первой и второй композиции клеток сравнивают для идентификации различий в экспрессии индивидуальных N-гликанов. Поскольку специфические гены гликотрансфераз связаны со связями N-гликанов,

результаты коррелируют с геномными данными (например, посредством РНК-секвенирования или анализа доступного для транспозазы хроматина с использованием секвенирования (АТАС-seq)), полученными для образцов первой и второй композиции. Корреляция идентифицирует изменения в экспрессии генов гликотрансфераз, сопровождающие специфические изменения в экспрессии поверхностных N-гликанов.

**[0529]** 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 предназначены для включения в объем настоящего описания.

Последовательности

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
1	ESKYGPPCPPCP	спейсер (шарнир IgG4) (ак)
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGC CCT	спейсер (шарнир IgG4) (н.)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGK	Шарнир-CH3-спейсер
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK	Шарнир-CH2-CH3- спейсер
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATT RNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGV YLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVA GKVPTGGVEEGLLERHSNGSQHSRLTLPRSLWNAGT SVTCTLNHPQLPQRLMALREPAAPVKLSLNLASSD PPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPA RPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDS RTLLNASRSLEVSIVTDH	IgD-шарнир-Fc
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIGDLHILPVAFRGDSFHTTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGE PREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMV GALLLLLV VALGIGLFM	EGFR
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 153-179 из No. доступа P10747)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 114-179 из No. доступа P10747)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (аминокислоты 180-220 из P10747)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL до GG)
12	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB (аминокислоты 214-255 из Q07011.1)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	CD3-дзета
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	CD3-дзета
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	CD3-дзета
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIGDL	EGFR

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
	HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAW PENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGL RSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKI ISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRN VSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAM NITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCRAGVMGENNT LVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPGPKI PSIATGMVGAALLLVVALGIGLFM	
17	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
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	atgcttctctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcct cctgatccca	Сигнальная последовательность альфа-цепи GMCSFR
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	Сигнальная последовательность альфа-цепи GMCSFR
26	MALPVTALLPLALLHA	Сигнальный пептид CD8- альфа
27	EPKSCDKTHTCPPCP	Шарнир
28	ERKCCVECPCPCP	Шарнир
29	ELKTPKLDITHTCPKRCPEPKSCDTPPPCPCRCPEPKSC DTPPPCPCRCPEPKSCDTPPPCPCPCP	Шарнир
30	ESKYGPPCPCPCP	Шарнир
31	X <sub>1</sub> PPX <sub>2</sub> P X <sub>1</sub> представляет собой глицин, цистеин или аргинин X <sub>2</sub> представляет собой цистеин или треонин	Шарнир
32	YGPPCPCPCP	Шарнир
33	KYGPPCPCPCP	Шарнир

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
34	EVVVKYGPCCPPCP	Шарнир
35	RASQDISKYLN	FMC63 CDR L1
36	SRLHSGV	FMC63 CDR L2
37	GNTLPYTFG	FMC63 CDR L3
38	DYGVS	FMC63 CDR H1
39	VIWGSETTYNSALKS	FMC63 CDR H2
40	YAMDYWG	FMC63 CDR H3
41	EVKLQESGPGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDN SKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYW GQGTSVTVSS	FMC63 VH
42	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT	FMC63 VL
43	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGK PGSGEGSTKGEVKLQESGPGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRL TIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSY AMDYWGQGTSVTVSS	FMC63 scFv
44	KASQNVGTNVA	SJ25C1 CDR L1
45	SATYRNS	SJ25C1 CDR L2
46	QQYNRYPYT	SJ25C1 CDR L3
47	SYWMN	SJ25C1 CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	SJ25C1 CDR H2
49	KTISSVDFYFDY	SJ25C1 CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWM NWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLT ADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFD YWGQGTTVTVSS	SJ25C1 VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVA WYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTL	SJ25C1 VL

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
	TITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	
52	GGGSGGGGSGGGGS	Линкер
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWM NWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLT ADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFD YWGQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFM STSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIY SATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFC QQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	SJ25C1 scFv
54	HYYYGGSYAMDY	FMC63 HC-CDR3
55	HTSRLHS	FMC63 LC-CDR2
56	QQGNTLPYT	FMC63 LC-CDR3
57	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcggcagcctgggcgac cgggtgaccatcagctgccgggagccaggacatcagcaagtacctaactggtatc agcagaagcccgacggcaccgtaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacag cggcgtgccagccgggttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatc tccaacctggaacaggaagatategccacctctttgccagcagggcaacacactgcc ctacacctttggcggcggaacaaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggc aagcctggcagcggcgagggcagcaccgaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcg gccctggcctggtggccccagccagagcctgagcgtgacctgaccgtgagcggcgt gagcctgccgactacggcgtgagctggatccggcagccccaggaaggcctgga atggctggcgtgatctggggcagcagaccacctactacaacagcgcctgaagagc cggctgaccatcatcaaggacaacagcaagagccaggtgttctgaagatgaacagcct gcagaccgacgacaccgcatctactactgcgccaagcactactactacggcggcagct acgcatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcagc	Последовательность, кодирующая scFv
58	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер
59	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTQVQLTQDGLNGKMYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDISEVQESWNGQ	Fc IgG2 человека (Uniprot P01859)

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
	PENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
60	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYTCNVDPKPKSTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	FcIgG4 человека (Uniprot P01861)
61	mrkllifsisaylmagivscgvsatpvtedrlalnavnapadntvniktdkvknaf gdglsqsaegtftfpadvttvktikmfiknecpnktcedewdryanvyvknkttgewy eigrfitpywvgtelprgleidvdfkllsgntelkiytetwlagreysvdfdivygt pdykysavvpviqynkssidgvpygkahtlgllkniqlptntekaylrntisgwghak pydagsrgcaewcfrthtiainnantfqhqlgalgesanpinnqspgnwapdragwc pgmavptridvlnnsltgstfsyeykfqswtngngdafyaissfviaksntpisapv vtn	Аминокислотная последовательность PNGазы F из Flavobacterium meningosepticum

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ идентификации профиля масс-спектрометрии (MS) композиции генетически модифицированных клеток, включающий:

(a) определение тестируемого профиля масс-спектрометрии образца из тестируемой композиции модифицированных клеток или ее подгруппы с использованием способа масс-спектрометрии, где указанная тестируемая композиция модифицированных клеток содержит иммунциты, содержащие рекомбинантный рецептор;

(b) сравнение тестируемого профиля масс-спектрометрии с эталонным профилем масс-спектрометрии; и

(c) идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в тестируемом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с эталонным профилем масс-спектрометрии, таким образом, идентификацию профиля масс-спектрометрии, уникального для образца.

2. Способ по п.1, где эталонный профиль масс-спектрометрии основан на образце из эталонной композиции, множестве образцов из эталонной композиции, или множестве образцов из множества эталонных композиций.

3. Способ по п.1 или п.2, где тестируемая композиция модифицированных клеток предназначена для использования в аутологичной клеточной терапии.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где тестируемую композицию модифицированных клеток получают способом, включающим:

(i) отбор или выделение иммунцитов из образца от субъекта, таким образом, получение композиции-источника, необязательно, где биологический образец представляет собой образец после лейкофереза, образец после афереза или образец цельной крови;

(ii) инкубацию клеток из композиции-источника с стимулирующим реагентом, таким образом, получение стимулированной композиции, где инкубацию, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов;

(iii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, в иммунциты из стимулированной композиции, таким образом, получение трансформированной композиции; и

(iv) культивирование стимулированной композиции при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов, таким образом, получение тестируемой композиции модифицированных клеток, где культивирование, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов.

5. Способ по любому из пп. 2-4, где в эталонную композицию или каждую из множества эталонных композиций не вводят молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции, и эталонная композиция содержит

иммуноциты, из которых тестируемая композиция модифицированных клеток произошла или получена.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции, где:

тестируемая композиция модифицированных клеток содержит иммуноциты, полученные от субъекта, где указанные иммуноциты содержат молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор; и

эталонная композиция содержит иммуноциты, полученные от субъекта, которые не содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный рецептор.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонной композиции, где тестируемая композиция модифицированных клеток получена на одной стадии способа, и эталонная композиция получена после, до или во время стадии, на которой получена тестируемая композиция модифицированных клеток.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где тестируемая композиция модифицированных клеток представляет собой образец, полученный от субъекта, которому ранее вводили композицию модифицированных клеток.

10. Способ по п.9, где образец, полученный от субъекта, содержит иммуноциты, модифицированные с использованием рекомбинантного рецептора, необязательно, как детектировано посредством проточной цитометрии или полимеразной цепной реакции (ПЦР).

11. Способ по п.9 или п.10, где образец, полученный от субъекта, представляет собой образец крови или образец опухоли.

12. Способ по любому из пп. 9-11, где образец, полученный от субъекта, получен между или между приблизительно 6 и 30 суток, между или между приблизительно 14 и 29 суток, или между или между приблизительно 17 и 22 суток после введения композиции модифицированных клеток субъекту.

13. Способ по любому из пп. 9-12, где образец получен от субъекта на время или приблизительно на время того, или непосредственно после того, как иммуноциты, модифицированные с использованием рекомбинантного рецептора, максимально поддаются детекции в крови субъекта.

14. Способ по любому из пп. 1-8, где тестируемая композиция модифицированных клеток содержит клетки, приведенные в контакт со средством для получения зависимой от рекомбинантного рецептора активности, необязательно, где средство представляет собой антиген-мишень, способный к связыванию рекомбинантным рецептором, или представляет собой антиидиотипическое антитело, специфическое для антитела.

15. Способ по любому из пп. 2-4 и 8-14, где эталонный профиль масс-спектрометрии представляет собой средний профиль масс-спектрометрии на основании ряда образцов из множества эталонных композиций.

16. Способ по п.15, где каждая из множества эталонных композиций содержит клетки, содержащие рекомбинантный рецептор.

17. Способ по п.15 или п.16, где каждая из множества эталонных композиций получена таким же способом или по существу таким же способом, как композиция модифицированных клеток.

18. Способ оценки способа получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий расчет величины изменчивости в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных среди ряда профилей масс-спектрометрии на основании образцов из множества эталонных композиций модифицированных клеток или его подгруппы, где каждая из множества эталонных композиций модифицированных клеток содержит рекомбинантный рецептор, полученный таким же способом или по существу таким же способом.

19. Способ для оценки способа получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий:

(а) получение ряда профилей масс-спектрометрии на основании образцов из множества эталонных композиций модифицированных клеток или его подгруппы, где каждая из множества эталонных композиций модифицированных клеток содержит рекомбинантный рецептор, полученный таким же способом или по существу таким же способом;

(б) получение эталонного профиля масс-спектрометрии на основании ряда профилей масс-спектрометрии; и

(с) определение величины изменчивости в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных среди ряда профилей масс-спектрометрии.

20. Способ по п.19, дополнительно включающий выбор способа получения композиции генетически модифицированных клеток, если величина изменчивости в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных среди ряда профилей масс-спектрометрии составляет не более чем 40%, не более чем 30%, не более чем 20%, не более чем 10% или не более чем 5% от уровня по меньшей мере одного компонента данных в эталонном профиле масс-спектрометрии.

21. Способ по любому из пп. 18-20, где каждая из множества эталонных композиций модифицированных клеток выбрана из (1) клеток в эталонной модифицированной композиции, (2) CD3+ клеток в эталонной модифицированной композиции; (3) CD4+ Т-клеток в эталонной модифицированной композиции; (4) CD8+ Т-клеток в эталонной модифицированной композиции; (5) рекомбинантный рецептор+ клеток в эталонной модифицированной композиции; (6) рекомбинантный рецептор+ CD3+ клеток в эталонной модифицированной композиции, (7) рекомбинантный рецептор+ CD8+ клеток в эталонной модифицированной композиции, или (8) рекомбинантный рецептор+ CD4+ клеток в эталонной модифицированной композиции.

22. Способ по любому из пп. 18-20, где каждая из множества эталонных композиций получена способом, включающим:

(i) отбор или выделение иммуноцитов из образца от субъекта, таким образом, получение композиции-источника, необязательно, где биологический образец представляет собой образец после лейкофереза, образец после афереза или образец цельной крови;

(ii) инкубацию клеток из композиции-источника с стимулирующим реагентом, таким образом, получение стимулированной композиции, где инкубацию, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов;

(iii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, в иммуноциты из стимулированной композиции, таким образом, получение трансформированной композиции; и

(iv) культивирование стимулированной композиции при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов, таким образом, получение тестируемой композиции модифицированных клеток, где культивирование, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов.

23. Способ по любому из пп. 1-17, где каждый из тестируемого профиля масс-спектрометрии и эталонного профиля масс-спектрометрии представляет собой пептидный профиль.

24. Способ по любому из пп. 1-17 и 23, где эталонный профиль масс-спектрометрии определяют с использованием такого же способа масс-спектрометрии, как тестируемый профиль масс-спектрометрии.

25. Способ характеристики способа получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий:

(a) определение первого профиля масс-спектрометрии образца из первой композиции клеток или ее подгруппы с использованием способа масс-спектрометрии;

(b) определение второго профиля масс-спектрометрии образца из второй композиции клеток или ее подгруппы с использованием способа масс-спектрометрии; и

(c) идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в первом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с вторым профилем масс-спектрометрии,

где первая композиция клеток и вторая композиция клеток содержат композиции на различных стадиях производственного процесса для получения композиции генетически модифицированных клеток.

26. Способ по п.25, где первая и вторая композиции клеток находятся на различных стадиях получения композиции генетически модифицированных клеток и выбраны из:

(i) композиции-источника, содержащей иммуноциты, отобранные или выделенные из биологического образца от субъекта, необязательно, где биологический образец представляет собой образец после лейкофереза, образец после афереза или образец цельной крови;

(ii) стимулированной композиции, содержащей иммуноциты из композиции-источника, приведенные в контакт с стимулирующим реагентом, необязательно, где приведение в контакт проводили в присутствии одного или более цитокинов;

(iii) трансформированной композиции, содержащей клетки из стимулированной композиции, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный рецептор;  
и

(iv) культивированной композиции, содержащей клетки из трансформированной композиции, культивированные при или приблизительно при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов, необязательно, где культивирование проводят в присутствии одного или более цитокинов.

27. Способ по п.25 или п.26, где первая композиция клеток представляет собой композицию с предшествующей стадии или предшествующей временной точки производственного процесса, по сравнению с второй композицией клеток.

28. Способ характеристики способа получения композиции генетически модифицированных клеток, включающий:

(a) определение первого профиля масс-спектрометрии образца из первой композиции клеток или ее подгруппы с использованием способа масс-спектрометрии;

(b) определение второго профиля масс-спектрометрии образца из второй композиции клеток или ее подгруппы с использованием способа масс-спектрометрии; и

(c) идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в первом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с вторым профилем масс-спектрометрии,

где первая композиция клеток и вторая композиция клеток содержат генетически модифицированные клетки, полученные различными способами.

29. Способ по п.28, где различные способы отличаются одним или более из присутствия или концентрации сыворотки; времени в культуре; партии реагента; манипуляций с реагентом или его хранения; присутствия или количества стимулирующего реагента; типа стимулирующего реагента; присутствия или количества одного или более цитокинов; присутствия или количества аминокислот; температуры; источника или типа иммуноцитов композиции-источника; соотношения или процента типов иммуноцитов в композиции-источнике, необязательно, соотношения CD4+/CD8+ клеток; плотности клеток; статической культуры; вращающейся культуры; перфузии; типа вирусного вектора; количества копий вектора; присутствия адьюванта для трансдукции; плотности клеток из композиции-источника при криоконсервировании; степени экспрессии рекомбинантного рецептора; или присутствия соединения для модуляции фенотипа клетки.

30. Способ по любому из пп. 25-29, где каждый из первого профиля масс-спектрометрии и второго профиля масс-спектрометрии представляет собой пептидный профиль.

31. Способ по любому из пп. 25-30, где первый профиль масс-спектрометрии и второй профиль масс-спектрометрии определяют с использованием такого же способа масс-спектрометрии.

32. Способ характеристики рекомбинантного рецептора, включающий получение, с использованием способа масс-спектрометрии, профиля масс-спектрометрии с использованием по меньшей мере одного компонента данных для рекомбинантного рецептора, выделенного из образца из композиции модифицированных клеток или ее подгруппы, содержащей иммуноциты, экспрессирующие или содержащие рекомбинантный рецептор.

33. Способ характеристики рекомбинантного рецептора, включающий:

(1) получение тестируемого профиля масс-спектрометрии, с использованием способа масс-спектрометрии, для образца из тестируемой композиции модифицированных клеток или ее подгруппы, содержащей иммуноциты, экспрессирующие или содержащие рекомбинантный рецептор, где указанный профиль масс-спектрометрии содержит по меньшей мере один компонент данных;

(2) получение эталонного профиля масс-спектрометрии, с использованием способа масс-спектрометрии, для образца из эталонной композиции или ее подгруппы, содержащей иммуноциты, где указанный эталонный профиль масс-спектрометрии включает по меньшей мере один компонент данных; и

(3) идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в тестируемом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с эталонным профилем масс-спектрометрии.

34. Способ по п.33, где тестируемая композиция модифицированных клеток и эталонная композиция являются по существу сходными, за исключением присутствия рекомбинантного рецептора, необязательно, где тестируемая композиция модифицированных клеток и эталонная композиция получены по существу сходным способом и/или содержат одинаковый тип иммуноцитов.

35. Способ по п.33 или п.34, где тестируемая композиция модифицированных клеток стимулирована в присутствии стимулирующего реагента.

36. Способ по любому из пп. 4, 22, 26, 29, и 35, где иммуноциты представляют собой Т-клетки, необязательно CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, и стимулирующий реагент является способным активировать один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одного или более компонентов комплекса TCR, и/или один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одной или более костимулирующих молекул.

37. Способ по п.36, где стимулирующий реагент содержит первичное средство, которое специфически связывает член комплекса TCR, и вторичное средство, которое специфически связывает костимулирующую молекулу Т-клетки.

38. Способ по п.37, где первичное средство специфически связывает CD3 и/или костимулирующую молекулу, выбранную из группы, состоящей из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

39. Способ по любому из пп. 4, 22, 26 и 35-38, где стимулирующий реагент содержит антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело против CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент.

40. Способ по любому из пп. 37-39, где первичное и вторичное средства присутствуют на поверхности твердой подложки, необязательно, где твердая подложка представляет собой бусину.

41. Способ по любому из пп. 37-39, где первичное и вторичное средства присутствуют на поверхности растворимого олигомерного реагента, содержащего стрептавидин или мутеин стрептавидаина.

42. Способ по п.35, где стимулирующий реагент представляет собой или содержит средство для получения зависимой от рекомбинантного рецептора активности, необязательно, где средство представляет собой антиген-мишень, способный к связыванию рекомбинантным рецептором, или представляет собой антиидиотипическое антитело, специфическое для антитела.

43. Способ по любому из пп. 4, 9-14, 33, и 35-42, дополнительно включающий идентификацию одного или более различий в тестируемом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с профилем масс-спектрометрии второй композиции модифицированных клеток, которая не была стимулирована в присутствии стимулирующего реагента или была стимулирована в присутствии другого стимулирующего реагента.

44. Способ по любому из пп. 1-43, где композиция клеток, такая как, независимо, тестируемая композиция модифицированных клеток, эталонная композиция, эталонная композиция модифицированных клеток, композиция-источник, стимулированная композиция, трансформированная композиция, композиция модифицированных клеток, первая композиция клеток, вторая композиция клеток и культивированная композиция, обогащена иммунocyтaми.

45. Способ по любому из пп. 1-44, где иммунocyтaы содержат лимфоциты.

46. Способ по п.45, где лимфоциты содержат Т-клетки или клетки естественные киллеры (NK).

47. Способ по п.46, где лимфоциты содержат Т-клетки, и Т-клетки представляют собой CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

48. Способ по любому из пп. 1-47, где иммунocyтaы являются человеческими.

49. Способ по любому из пп. 4, 22, 26 и 29-31, где культивирование проводят в условиях для стимуляции пролиферации и/или размножения модифицированных клеток.

50. Способ по любому из пп. 1-49, где образец перерабатывают из тестируемой композиции модифицированных клеток посредством мечения одного или более поверхностных белков, лизиса клеток и выделения одного или более поверхностных белков для получения одного или более выделенных белков.

51. Способ по п.50, дополнительно включающий расщепление одного или более выделенных белков.

52. Способ оценки поверхностных белков из композиции модифицированных клеток, включающий:

(a) мечение одного или более поверхностных белков, присутствующих на клетках образца из композиции модифицированных клеток или ее подгруппы, где композиция модифицированных клеток содержит клетки, экспрессирующие или содержащие рекомбинантный рецептор, таким образом, получение композиции меченых клеток;

(b) лизис клеток из композиции меченых клеток, таким образом, получение композиции лизированных клеток;

(c) выделение одного или более поверхностных белков из композиции лизированных клеток для получения одного или более выделенных белков; и

(d) подвергание одного или более выделенных белков способу масс-спектрометрии для получения профиля масс-спектрометрии, содержащего один или более компонентов данных.

53. Способ по п.52, который, перед (d), дополнительно включает расщепление одного или более выделенных белков.

54. Способ по п.51 или п.53, где расщепление проводят посредством протеолиза в присутствии одной или более протеаз, способных к разрезанию одной или более пептидных связей.

55. Способ по п.54, где одна или более протеаз представляют собой или содержат трипсин.

56. Способ по любому из пп. 50-55, где один или более выделенных белков содержат мембранные белки поверхности клеток.

57. Способ по любому из пп. 50-56, где лизис клеток включает инкубацию в присутствии детергента.

58. Способ по п.57, где детергент представляет собой неионный детергент.

59. Способ по п.58, где детергент представляет собой или содержит эффективное количество Triton X-100.

60. Способ по п.57, где детергент представляет собой денатурирующий детергент.

61. Способ по п.60, где денатурирующий детергент представляет собой или содержит эффективное количество додецилсульфата натрия (SDS).

62. Способ по любому из пп. 57-61, где после лизиса клеток, способ дополнительно включает удаление детергента из лизированных клеток.

63. Способ по любому из пп. 50-62, где мечение одного или более поверхностных белков включает биотиновое мечение первичных аминов.

64. Способ по п.63, где один или более поверхностных белков выделяют с использованием реагента, содержащего авидин, стрептавидин, NeutrAvidin™ или CaptAvidin™.

65. Способ по любому из пп. 1-64, где способ масс-спектрометрии включает подвергание образца жидкостной хроматографии (LC) с последующей масс-спектрометрией.

66. Способ по п.65, где жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографию (UHPLC) или сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

67. Способ по п.65 или п.66, где жидкостная хроматография представляет собой сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

68. Способ по любому из пп. 65-67, где жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию проводят поточным способом.

69. Способ по любому из пп. 65-68, где жидкостная хроматография выбрана из нормальнофазовой (NP-), обращеннофазовой (RP) и хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC).

70. Способ по любому из пп. 65-69, где масс-спектрометр, осуществляющий масс-спектрометрию, включает один или более из квадрупольного, содержащего ионную ловушку, времяпролетного (TOF) или использующего ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье масс-анализатора.

71. Способ по п.70, где масс-спектрометр включает содержащий ионную ловушку масс-анализатор, представляющий собой трехмерную квадрупольную ионную ловушку, цилиндрическую ионную ловушку, линейную квадрупольную ионную ловушку, или масс-анализатор Orbitrap.

72. Способ по п.71, где масс-спектрометр представляет собой квадрупольный масс-спектрометр Orbitrap.

73. Способ по любому из пп. 1-72, где по меньшей мере один компонент данных выбран из информации о MS ионов, общей ионной хроматограммы (TIC) или ее части, экстракционной ионной хроматограммы (XIC) или ее части, сигнального пика ионов при пептидной MS, сигнального пика ионов при белковой MS, идентификационной информации пептида, идентификационной информации белка, качественной информации, количественной информации, структурной информации и посттрансляционных модификаций.

74. Способ по п.73, где по меньшей мере один компонент данных представляет собой XIC или ее часть, где XIC или ее часть основана на одном или более теоретических или известных значениях  $m/z$  для одного или более пептидных компонентов рекомбинантного рецептора.

75. Способ по п.74, где один или более пептидных компонентов представляет собой протеолитически разрезанный или расщепленный пептидный компонент, необязательно, где один или более пептидных компонентов является протеолитически расщепленным или расщепленным посредством трипсина.

76. Способ по любому из пп. 1-75, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный рецептор антигена.

77. Способ по любому из пп. 1-76, где рекомбинантный рецептор является способным связывать антиген-мишень, ассоциированный с, специфический для и/или экспрессированный на клетке или ткани при заболевании, нарушении или состоянии.

78. Способ по п.77, где заболевание, нарушение или состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, или опухоль или злокачественную опухоль.

79. Способ по п.77 или п.78, где антиген-мишень представляет собой антиген опухоли.

80. Способ по любому из пп. 77-79, где антиген-мишень выбран среди интегрина  $\alpha\beta6$  (интегрин  $\alpha\beta6$ ), антигена созревания В-клеток (BCMA), В7-Н3, В7-Н6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково/тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1В (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина А2, лиганда 1 хемокинов с мотивом С-С (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), укороченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), 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 5D (GPCR5D), 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 $\alpha$ ), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 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, экспрессированных HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

81. Способ по любому из пп. 1-80, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не относящийся к TCR рецептор антигена или TCR, или его антигенсвязывающий фрагмент.

82. Способ по любому из пп. 1-81, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

83. Способ по любому из пп. 1-82, где образец содержит (1) клетки в композиции клеток, (2) CD3+ клетки в композиции клеток; (3) CD4+ Т-клетки в композиции клеток; (4) CD8+ Т-клетки в композиции клеток; (5) рекомбинантный рецептор+ клетки в композиции клеток; (6) рекомбинантный рецептор+ CD3+ клетки в композиции клеток, (7) рекомбинантный рецептор+ CD8+ клетки в композиции клеток или (8) рекомбинантный рецептор+ CD4+ клетки в композиции клеток, необязательно, где рекомбинантный рецептор представляет собой CAR.

84. Композиция модифицированных клеток, где композиция модифицированных клеток получена способом, в котором уровень по меньшей мере одного компонента данных из профиля масс-спектрометрии, полученного с использованием способа масс-спектроскопии, образца из композиции модифицированных клеток или ее подгруппы является изменчивым не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5% от уровня по меньшей мере одного компонента данных из эталонного профиля масс-спектрометрии на основании ряда профилей масс-спектрометрии образцов из множества композиций модифицированных клеток, полученных этим способом, или отличается от такого эталона не более чем на стандартное отклонение уровня по меньшей мере компонента данных среди ряда профилей масс-спектрометрии.

85. Композиция модифицированных клеток по п.84, где композиция модифицированных клеток содержит рекомбинантный рецептор.

86. Композиция модифицированных клеток по п.84 или п.85, где композиция модифицированных клеток содержит иммунциты.

87. Композиция модифицированных клеток по п.86, где способ получения композиции модифицированных клеток включает:

(i) отбор или выделение иммуноцитов из образца от субъекта, таким образом, получение композиции-источника, необязательно, где биологический образец представляет собой образец после лейкофереза, образец после афереза или образец цельной крови;

(ii) инкубацию клеток из композиции-источника с стимулирующим реагентом, таким образом, получение стимулированной композиции, где инкубацию, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов;

(iii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, в иммуноциты из стимулированной композиции, таким образом, получение трансформированной композиции; и

(iv) культивирование стимулированной композиции при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов, таким образом, получение композиции модифицированных клеток, где культивирование, необязательно, проводят в присутствии одного или более цитокинов.

88. Композиция модифицированных клеток по п.86 или п.87, где композиция клеток, такая как, независимо, композиция модифицированных клеток, композиция-источник, стимулированная композиция и трансформированная композиция, обогащена иммуноцитами.

89. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 86-88, где иммуноциты содержат лимфоциты.

90. Композиция модифицированных клеток по п.89, где лимфоциты содержат Т-клетки или клетки естественные киллеры (NK).

91. Композиция модифицированных клеток по п.90, где лимфоциты содержат Т-клетки, и Т-клетки представляют собой CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

92. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 86-91, где иммуноциты являются человеческими.

93. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 87-92, где иммуноциты представляют собой Т-клетки, необязательно CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, и стимулирующий реагент является способным активировать один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одного или более компонентов комплекса TCR, и/или один или более внутриклеточных передающих сигналы доменов одной или более костимулирующих молекул.

94. Композиция модифицированных клеток по п.93, где стимулирующий реагент содержит первичное средство, которое специфически связывает член комплекса TCR, и вторичное средство, которое специфически связывает костимулирующую молекулу Т-клетки.

95. Композиция модифицированных клеток по п.94, где первичное средство специфически связывает CD3 и/или костимулирующую молекулу, выбранную из группы, состоящей из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

96. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 87-95, где стимулирующий реагент содержит антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело против CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент.

97. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 94-96, где первичное и вторичное средства присутствуют на поверхности твердой подложки, необязательно, где твердая подложка представляет собой бусину.

98. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 94-97, где первичное и вторичное средства присутствуют на поверхности растворимого олигомерного реагента, содержащего стрептавидин или мутеин стрептавидина.

99. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 87-98, где культивирование проводят в условиях для стимуляции пролиферации и/или размножения композиции модифицированных клеток.

100. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 84-99, где образец перерабатывают из композиции модифицированных клеток посредством мечения одного или более поверхностных белков, лизиса клеток и выделения одного или более поверхностных белков для получения одного или более выделенных белков.

101. Композиция модифицированных клеток по п.100, дополнительно включающая расщепление одного или более выделенных белков.

102. Композиция модифицированных клеток по п.100 или п.101, где расщепление проводят посредством протеолиза в присутствии одной или более протеаз, способных к разрезанию одной или более пептидных связей.

103. Композиция модифицированных клеток по п.102, где одна или более протеаз представляют собой или содержат трипсин.

104. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 100-103, где один или более выделенных белков содержат мембранные белки поверхности клеток.

105. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 100-104, где лизис клеток включает инкубацию в присутствии детергента.

106. Композиция модифицированных клеток по п.105, где детергент представляет собой неионный детергент.

107. Композиция модифицированных клеток по п.106, где детергент представляет собой или содержит эффективное количество Triton X-100.

108. Композиция модифицированных клеток по п.105, где детергент представляет собой денатурирующий детергент.

109. Композиция модифицированных клеток по п.108, где денатурирующий детергент представляет собой или содержит эффективное количество додецилсульфата натрия (SDS).

110. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 100-109, где после лизиса клеток, способ дополнительно включает удаление детергента из лизированных клеток.

111. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 100-110, где мечение поверхностных белков включает биотиновое мечение первичных аминов.

112. Композиция модифицированных клеток по п.111, где один или более поверхностных белков выделяют с использованием реагента, содержащего авидин, стрептавидин, NeutrAvidin™ или CaptAvidin™.

113. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 84-112, где способ масс-спектрометрии включает подвергание образца жидкостной хроматографии (LC) с последующей масс-спектрометрией.

114. Композиция модифицированных клеток по п.113, где жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографию (UHPLC) или сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

115. Композиция модифицированных клеток по п.113 или п.114, где жидкостная хроматография представляет собой сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

116. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 113-115, где жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию проводят поточным способом.

117. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 113-116, где жидкостная хроматография выбрана из нормальнофазовой (NP-), обращеннофазовой (RP) и хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC).

118. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 113-117, где масс-спектрометр, осуществляющий масс-спектрометрию, включает один или более из квадрупольного, содержащего ионную ловушку, времяпролетного (TOF) или использующего ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье масс-анализатора.

119. Композиция модифицированных клеток по п.118, где масс-спектрометр включает содержащий ионную ловушку масс-анализатор, представляющий собой трехмерную квадрупольную ионную ловушку, цилиндрическую ионную ловушку, линейную квадрупольную ионную ловушку, или масс-анализатор Orbitrap.

120. Композиция модифицированных клеток по п.119, где масс-спектрометр представляет собой квадрупольный масс-спектрометр Orbitrap.

121. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 84-120, где по меньшей мере один компонент данных выбран из информации о MS ионов, общей ионной хроматограммы (TIC) или ее части, экстракционной ионной хроматограммы (XIC) или ее части, сигнального пика ионов при пептидной MS, сигнального пика ионов при белковой MS, идентификационной информации пептида, идентификационной информации белка, качественной информации, количественной информации, структурной информации и посттрансляционных модификаций.

122. Композиция модифицированных клеток по п.121, где компонент данных представляет собой XIC или ее часть, где XIC или ее часть основана на одном или более

теоретических или известных значениях  $m/z$  для одного или более пептидных компонентов рекомбинантного рецептора.

123. Композиция модифицированных клеток по п.122, где один или более пептидных компонентов представляет собой протеолитически разрезанный или расщепленный пептидный компонент, необязательно, где один или более пептидных компонентов является протеолитически разрезанным или расщепленным посредством трипсина.

124. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 85-123, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит химерный рецептор и/или рекомбинантный рецептор антигена.

125. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 85-124, где рекомбинантный рецептор является способным связывать антиген-мишень, ассоциированный с, специфический для и/или экспрессированный на клетке или ткани при заболевании, нарушении или состоянии.

126. Композиция модифицированных клеток по п.125, где заболевание, нарушение или состояние представляет собой инфекционное заболевание или нарушение, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, или опухоль или злокачественную опухоль.

127. Композиция модифицированных клеток по п.125 или п.126, где антиген-мишень представляет собой антиген опухоли.

128. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 125-127, где антиген-мишень выбран среди интегрина  $\alpha\beta6$  (интегрин  $\alpha\text{v}\beta6$ ), 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), укороченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), 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 5D (GPCR5D), 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 $\alpha$ ), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 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, мышинового 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.

129. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 85-128, где рекомбинантный рецептор представляет собой или содержит функциональный не относящийся к TCR рецептор антигена или TCR, или его антигенсвязывающий фрагмент.

130. Композиция модифицированных клеток по любому из пп. 85-129, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

131. Способ оценки реагента, используемого в способе получения композиции модифицированных клеток, включающий:

(а) сравнение тестируемого профиля масс-спектрометрии образца из реагента с эталонным профилем масс-спектрометрии реагента, где тестируемый профиль масс-спектрометрии получен с использованием способа масс-спектрометрии; и

(с) идентификацию одного или более различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных в тестируемом профиле масс-спектрометрии, по сравнению с эталонным профилем масс-спектрометрии, таким образом, идентификацию профиля масс-спектрометрии реагента.

132. Способ по п.131, где эталонный профиль масс-спектрометрии получен для образца из эталонного реагента или основан на ряде профилей масс-спектрометрии образцов из множества различных партий реагента.

133. Способ по п.132, где эталонный профиль масс-спектрометрии представляет собой средний профиль масс-спектрометрии на основании образцов из множества различных партий реагента.

134. Способ по п.133, дополнительно включающий определение различий в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных между тестируемым профилем масс-спектрометрии и средним профилем масс-спектрометрии.

135. Способ по пп.132 или 133, дополнительно включающий выбор реагента, если величина изменчивости в присутствии, отсутствии или уровне по меньшей мере одного компонента данных среди ряда профилей масс-спектрометрии составляет не более чем 40%, не более чем 30%, не более чем 20%, не более чем 10% или не более чем 5% от уровня по меньшей мере одного компонента данных в эталонном профиле масс-спектрометрии.

136. Способ по п.132 или 134, дополнительно включающий выбор реагента, если уровень по меньшей мере одного компонента данных тестируемого профиля масс-спектрометрии является изменчивым не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 20%, не более чем на 10% или не более чем на 5% от уровня по меньшей мере одного компонента данных из эталонного профиля масс-спектрометрии, или изменяется от такого уровня не более чем на стандартное отклонение уровня по меньшей мере компонента данных среди ряда профилей масс-спектрометрии.

137. Способ по любому из пп. 131-136, где способ масс-спектрометрии включает подвергание образца жидкостной хроматографии (LC) с последующей масс-спектрометрией.

138. Способ по п.137, где жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографию (UHPLC) или сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

139. Способ по п.137 или п.138, где жидкостная хроматография представляет собой сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC).

140. Способ по любому из пп. 137-139, где жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию проводят поточным способом.

141. Способ по любому из пп. 137-140, где жидкостная хроматография выбрана из нормальнофазовой (NP-), обращеннофазовой (RP) и хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC).

142. Способ по любому из пп. 137-141, где масс-спектрометр, осуществляющий масс-спектрометрию, включает один или более из квадрупольного, содержащего ионную ловушку, времяпролетного (TOF) или использующего ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье масс-анализатора.

143. Способ по п.142, где масс-спектрометр включает содержащий ионную ловушку масс-анализатор, представляющий собой трехмерную квадрупольную ионную

ловушку, цилиндрическую ионную ловушку, линейную квадрупольную ионную ловушку, или масс-анализатор Orbitrap.

144. Способ по п.143, где масс-спектрометр представляет собой квадрупольный масс-спектрометр Orbitrap.

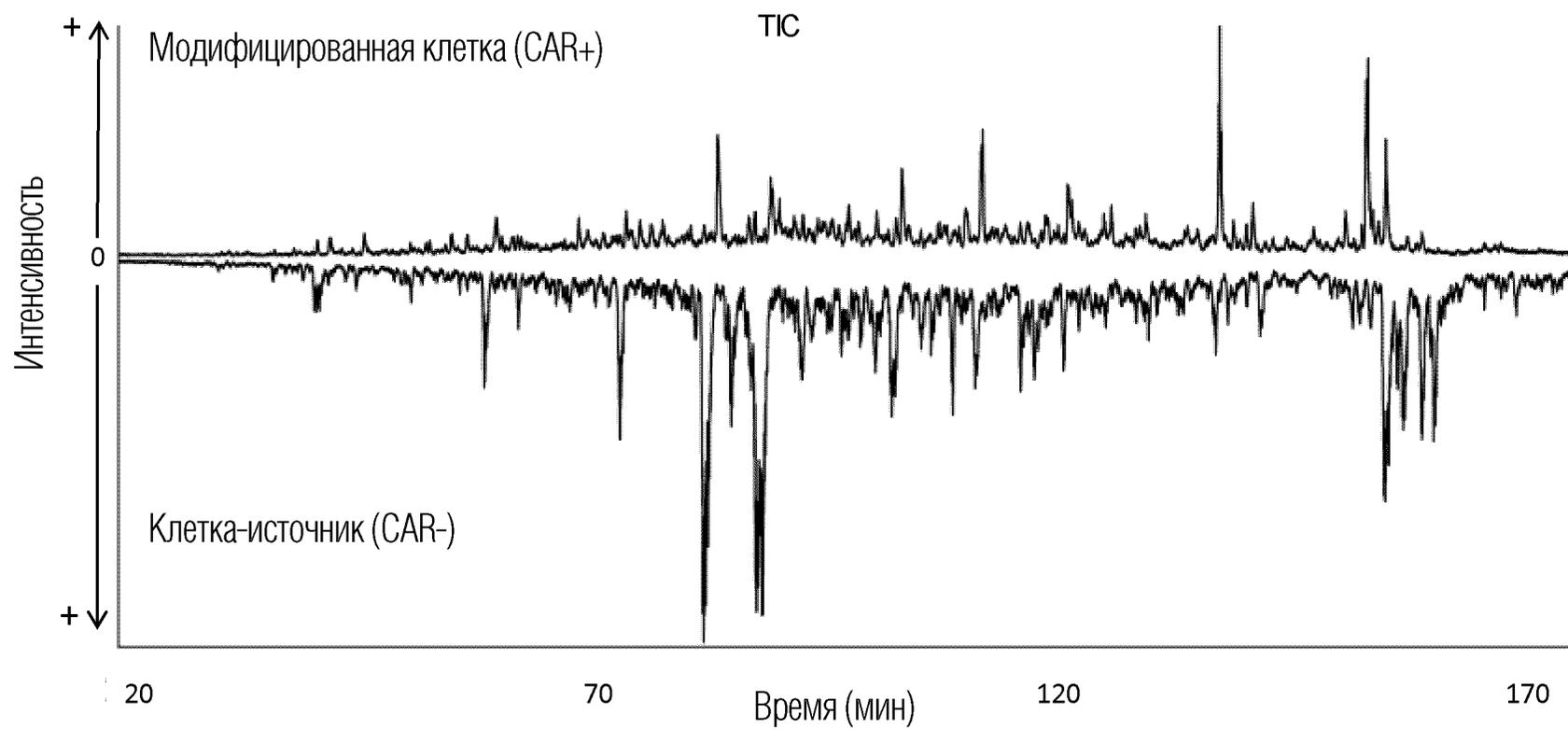
145. Способ по любому из пп. 131-144, где по меньшей мере один компонент данных выбран из информации о MS ионов, общей ионной хроматограммы (TIC) или ее части, экстракционной ионной хроматограммы (XIC) или ее части, сигнального пика ионов при пептидной MS, сигнального пика ионов при белковой MS, идентификационной информации пептида, идентификационной информации белка, качественной информации, количественной информации, структурной информации и посттрансляционных модификаций.

146. Способ по любому из пп. 131-145, где реагент представляет собой реагент, способный стимулировать сигнал в клетках из композиции клеток, необязательно, композиции Т-клеток.

147. Способ по п.146, где клетки из композиции клеток содержат рекомбинантный рецептор, необязательно, химерный рецептор антигена.

148. Способ по п.147, где реагент является способным стимулировать или индуцировать зависимую от рекомбинантного рецептора активность в клетках из композиции клеток.

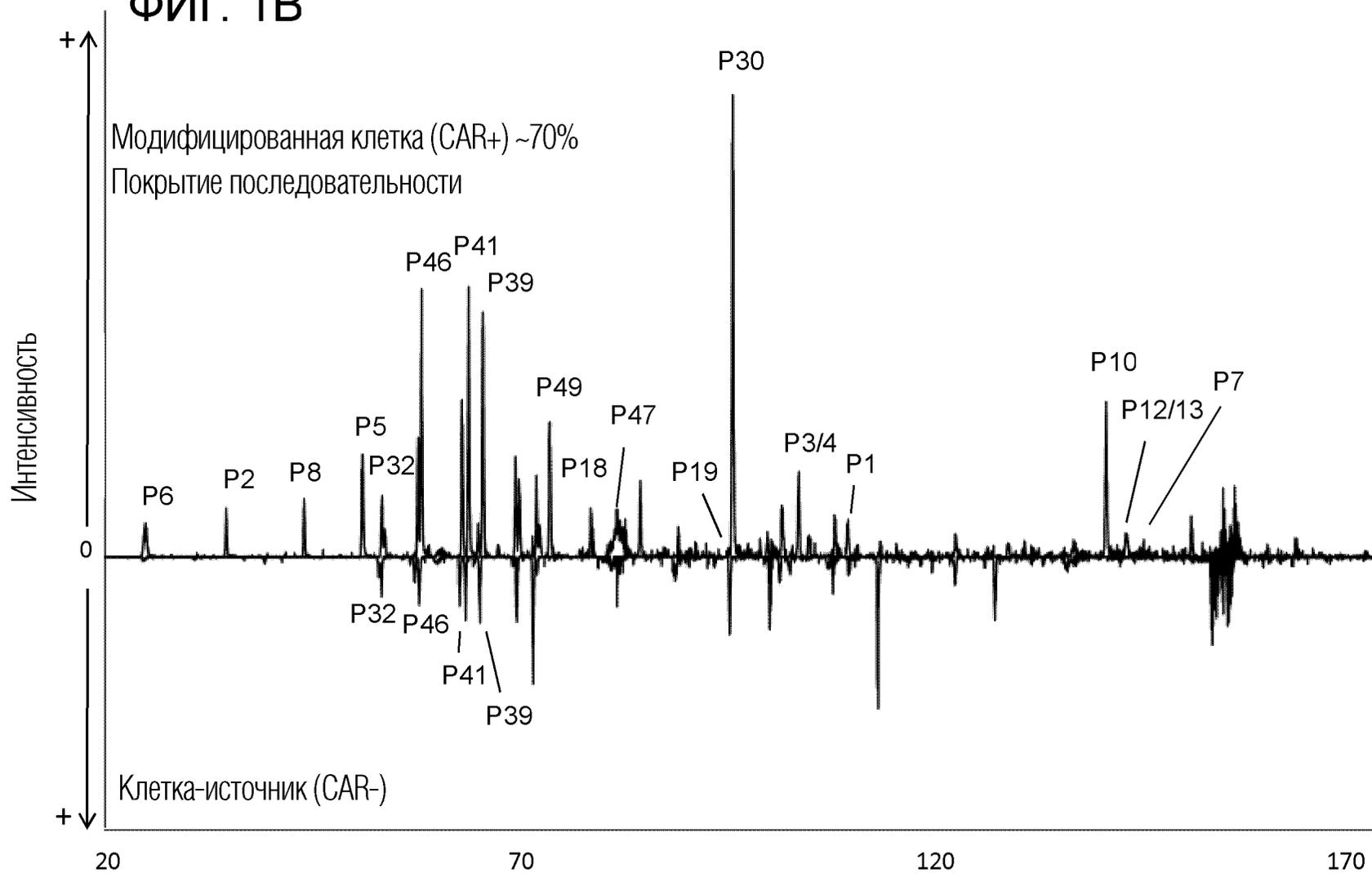
ФИГ. 1А



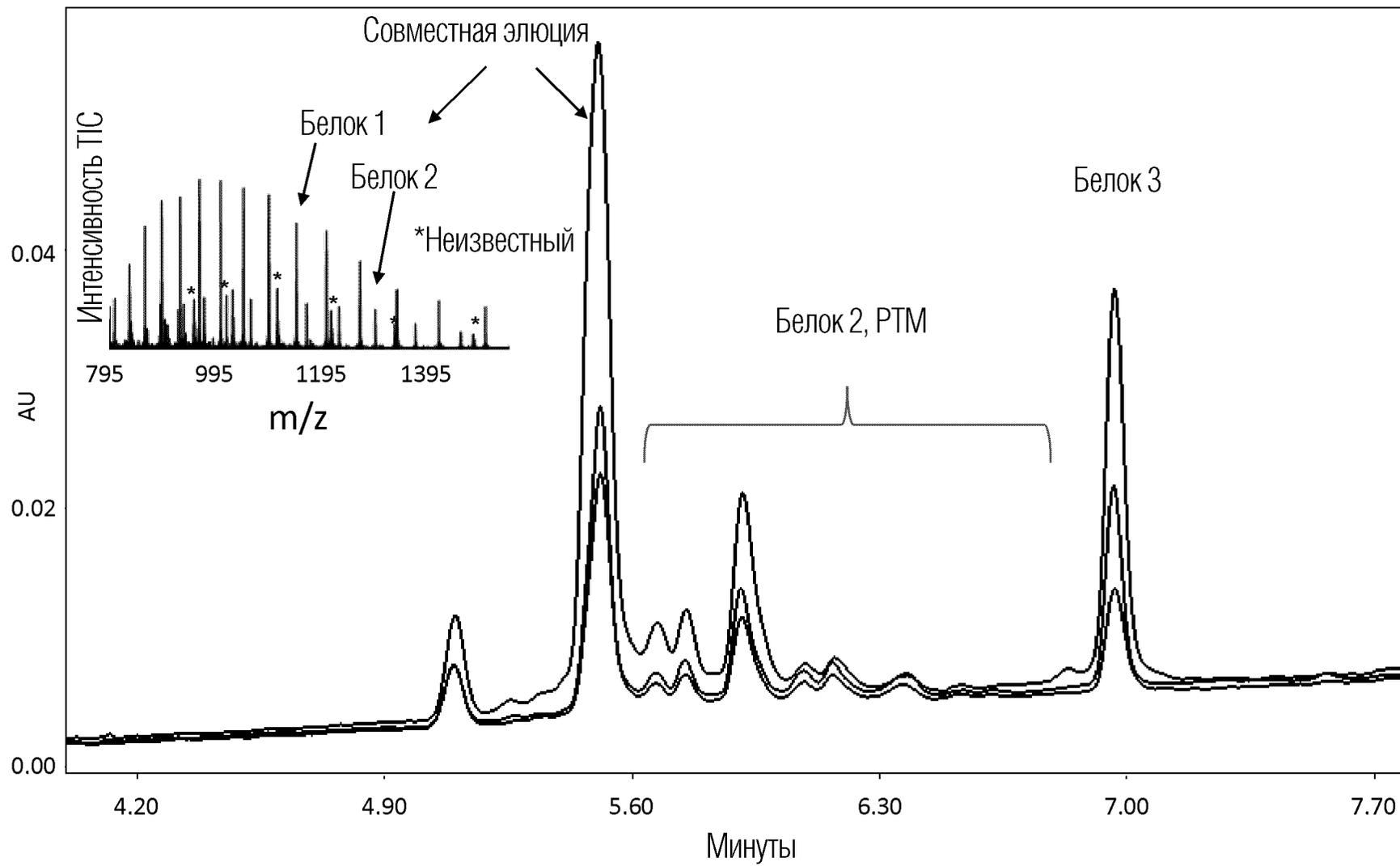
177

567478

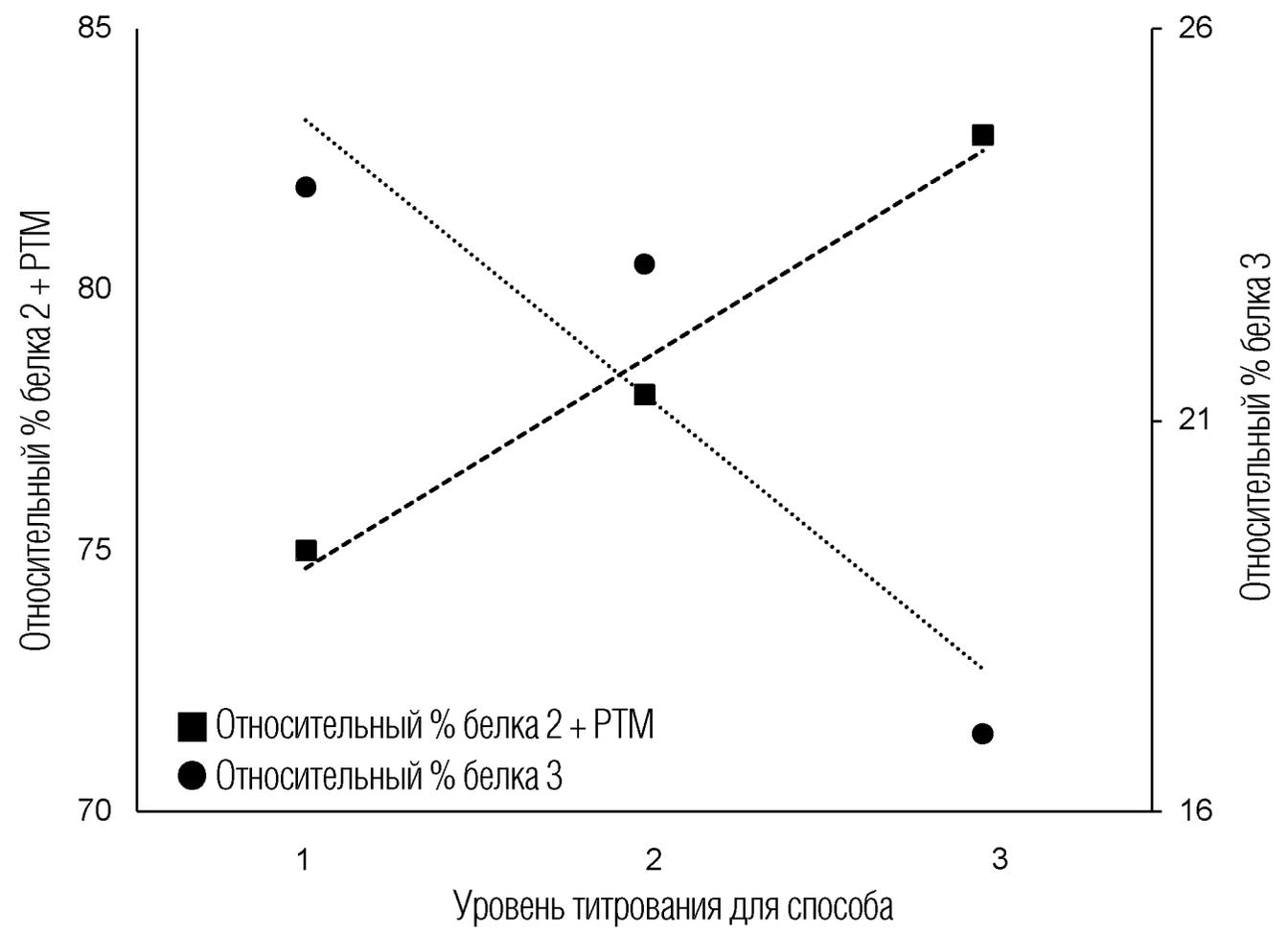
ФИГ. 1В



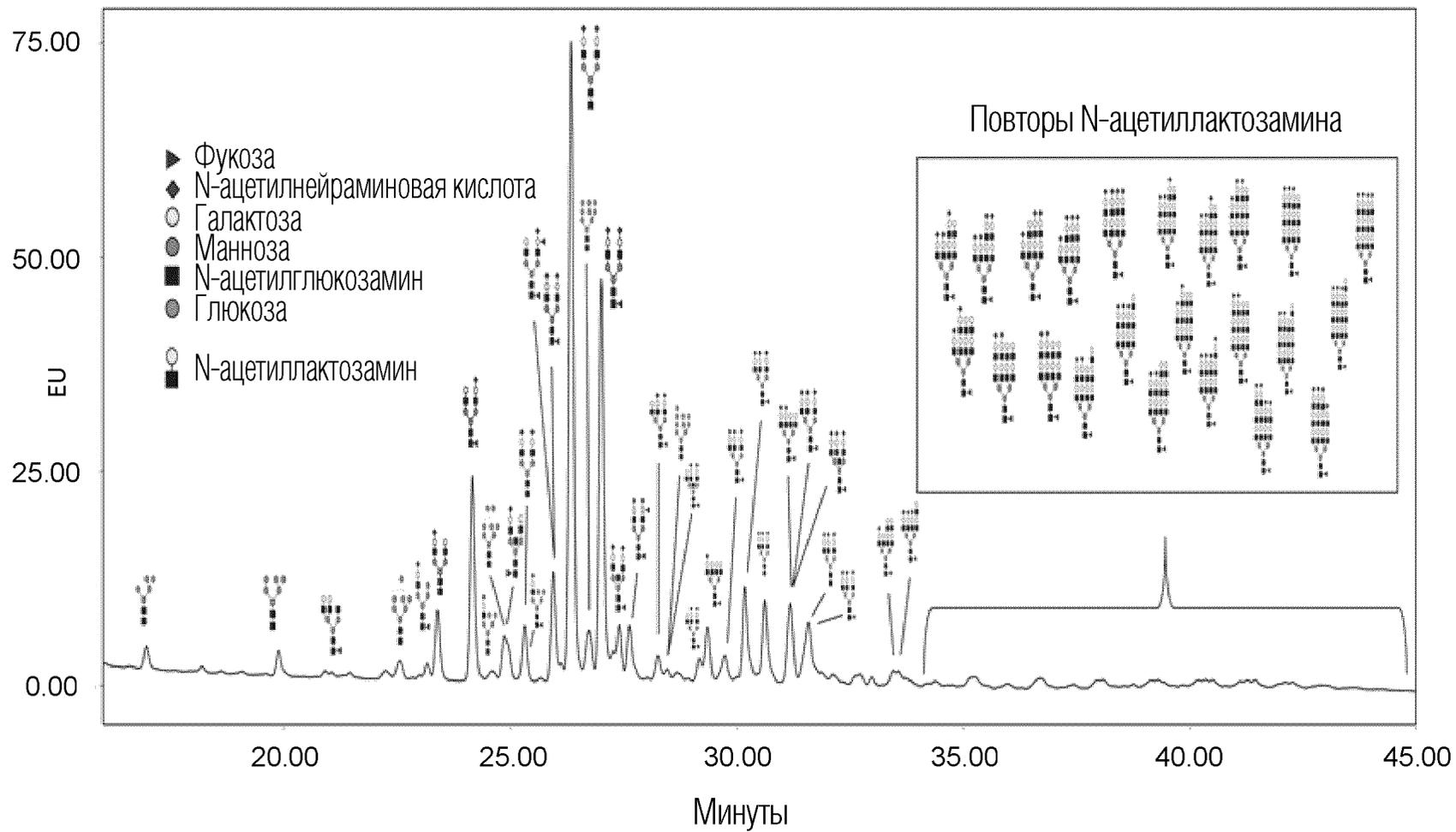
ФИГ. 2



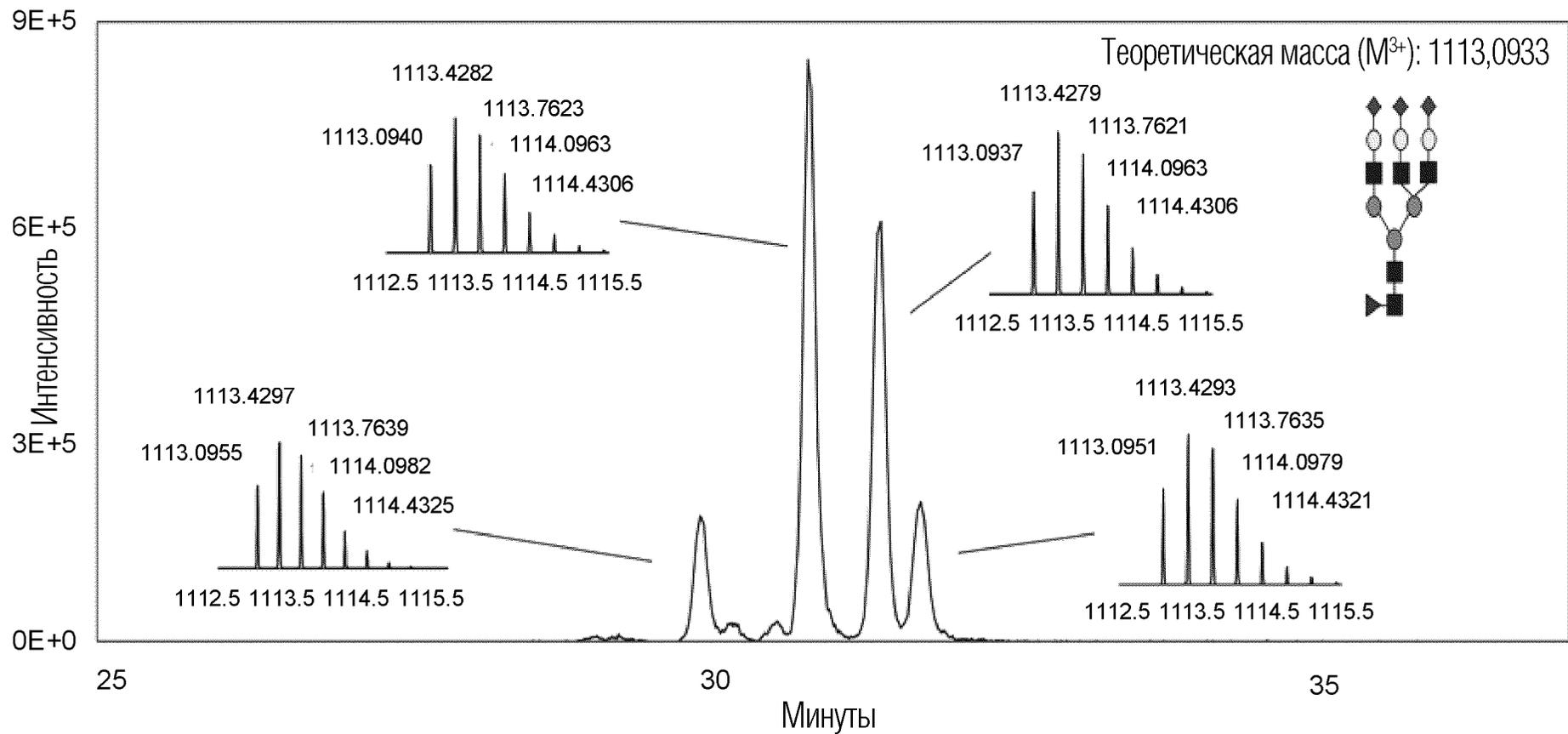
ФИГ. 3



ФИГ. 4А



ФИГ. 4В



ФИГ. 4С

