

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191174** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.10.12

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.10.30

(54) **СПОСОБЫ ОТБОРА И СТИМУЛЯЦИИ КЛЕТОК И УСТРОЙСТВО ДЛЯ ЭТОГО**

(31) 62/753,911; 62/842,511; 62/861,314

(32) 2018.10.31; 2019.05.02; 2019.06.13

(33) US

(86) PCT/EP2019/079746

(87) WO 2020/089343 2020.05.07

(71) Заявитель:
ДЖУНО ТЕРАПЬЮТИКС ГМБХ
(DE)

(72) Изобретатель:

Гермерот Лотар, Штембергер
Кристиан, Полторак Матеуш Павел,
Шмидт Томас (DE)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способам отбора и стимуляции множества клеток в образце клеток с использованием хроматографии на колонке и сбора клеток без использования дополнительных стадий или реагентов для облегчения открепления клеток из колонки. В некоторых аспектах способы, представленные в настоящем описании, уменьшают время, необходимое для получения популяции отобранных и стимулированных клеток, которую можно использовать для генетической инженерии, и в конечном счете, клеточной терапии, по сравнению с существующими способами. Настоящее изобретение относится также к изделиям и устройству для этого.

202191174
A1

202191174

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568547EA/032

СПОСОБЫ ОТБОРА И СТИМУЛЯЦИИ КЛЕТОК, И УСТРОЙСТВО ДЛЯ ЭТОГО

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет Предварительной патентной заявки США 62/753911, поданной 31 октября 2018 г., озаглавленной «METHODS FOR SELECTION AND STIMULATION OF CELLS AND KITS AND APPARATUS FOR SAME», Предварительной патентной заявки США No. 62/842511, поданной 2 мая 2019 г., озаглавленной «METHODS FOR SELECTION AND STIMULATION OF CELLS AND KITS AND APPARATUS FOR SAME», и Предварительной патентной заявки США No. 62/861314, поданной 13 июня 2019 г., озаглавленной «METHODS FOR SELECTION AND STIMULATION OF CELLS AND KITS AND APPARATUS FOR SAME», полное содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки для всех целей.

Включение списка последовательностей в качестве ссылки

[0002] Настоящая заявка подана вместе со списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей представлен в форме файла, озаглавленного 7350423019240SeqList.txt, созданного 29 октября 2019 г., имеющего размер 94112 байт. Полная информация в электронном формате из списка последовательностей приведена в качестве ссылки.

Область изобретения

[0003] Настоящее изобретение относится к способам отбора и стимуляции множества клеток в образце клеток с использованием хроматографии на колонке, и сбора и/или элюции клеток без использования дополнительных стадий или реагентов для облегчения открепления клеток от колонки. В некоторых аспектах, способы, представленные в настоящем описании, уменьшают время, необходимое для получения популяции отобранных и стимулированных клеток, которую можно использовать для генетической инженерии, и в конечном счете, клеточной терапии, по сравнению с существующими способами. Настоящее изобретение относится также к изделиям и устройству для этого.

Уровень техники

[0004] Различные способы клеточной терапии являются доступными для лечения заболеваний и состояний. Среди способов клеточной терапии присутствуют способы, включающие иммунциты, такие как Т-клетки (например, CD4+ и CD8+ Т-клетки), которые могут являться генетически модифицированными с использованием рекомбинантного рецептора, такого как химерные рецепторы антигенов. Способы получения пригодных популяций клеток, например, отобранных (обогащенных) и стимулированных популяций клеток для использования в таких видах клеточной терапии часто требуют отдельных стадий отбора и стимуляции, которые могут продлевать производственный процесс. Кроме того, способы отбора могут включать стадии, загрязняющие отобранные клетки связанными с отбором частицами, например, такими

как средства для отбора, такие как фрагменты Fab и конкурентные реагенты и/или свободные связывающие средства, используемые для облегчения открепления клеток из стационарной фазы, таким образом, требуют дополнительных стадий промывки и/или замены сред для очистки выходной композиции. Дополнительные стадии переработки могут приводить к стрессу клеток, потенциально влияя на нижестоящую переработку клеток или даже биологию клеток, в дополнение к необходимости значительного времени для завершения. Таким образом, необходимы улучшенные способы получения популяций клеток, пригодных для использования, например, в клеточной терапии, которые минимизируют манипуляции с клетками и время переработки. Настоящее изобретение относится к способам, изделиям и устройству, удовлетворяющим такую необходимость.

Сущность изобретения

[0005] Настоящее изобретение относится к способам стимуляции на колонке Т-клеток, включающим: добавление олигомерного стимулирующего реагента, способного доставлять стимулирующий сигнал Т-клеткам в стационарной фазе, содержащей множество иммобилизованных Т-клеток, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками, где: стационарная фаза включает средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток или их подгруппы; олигомерный стимулирующий реагент включает одно или несколько стимулирующих средств, включающих (i) первое стимулирующее средство, представляющее собой антитело против CD3, и (ii) второе стимулирующее средство, представляющее собой антитело против CD28; и в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки. В представленном способе, средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток или их подгрупп, иммобилизует множество Т-клеток на стационарной фазе.

[0006] Настоящее изобретение относится к способам стимуляции на колонке Т-клеток, включающим: инкубацию олигомерного стимулирующего реагента, способного доставлять стимулирующий сигнал Т-клеткам, с множеством Т-клеток, иммобилизованных на стационарной фазе, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками, где: стационарная фаза включает средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток или их подгруппы; олигомерный стимулирующий реагент включает одно или несколько стимулирующих средств, включающих (i) первое стимулирующее средство, представляющее собой антитело против CD3, и (ii) второе стимулирующее средство, представляющее собой антитело против CD28; и в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки. В представленном

способе, средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток или их подгрупп, иммобилизует множество Т-клеток на стационарной фазе.

[0007] Настоящее изобретение относится к способам стимуляции на колонке Т-клеток, включающим: объединение олигомерного стимулирующего реагента, способного доставлять стимулирующий сигнал Т-клеткам, с множеством Т-клеток, иммобилизованных на стационарной фазе, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками, где: стационарная фаза включает средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток или их подгруппы; олигомерный стимулирующий реагент включает одно или несколько стимулирующих средств, включающих (i) первое стимулирующее средство, представляющее собой антитело против CD3, и (ii) второе стимулирующее средство, представляющее собой антитело против CD28; и в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки. В представленном способе, средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток или их подгрупп, иммобилизует множество Т-клеток на стационарной фазе.

[0008] Настоящее изобретение относится к способам стимуляции Т-клеток на колонке, включающим инкубацию множества Т-клеток, иммобилизованных на стационарной фазе, с одним или несколькими стимулирующими средствами для доставки стимулирующего сигнала одной или нескольким Т-клеткам из множества Т-клеток, где указанная стационарная фаза включает средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток, где специфическое связывание средства для отбора с селективным маркером, экспрессированным одной или несколькими Т-клетками, вызывает иммобилизацию одной или нескольких Т-клеток на стационарной фазе; и в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести без добавления конкурентного средства или свободного связывающего средства для элюции множества Т-клеток из стационарной фазы, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки. Настоящее изобретение относится к способам стимуляции Т-клеток на колонке, включающим инкубацию множества Т-клеток, иммобилизованных на стационарной фазе, с одним или несколькими стимулирующими средствами для доставки стимулирующего сигнала одной или нескольким Т-клеткам из множества Т-клеток, где указанная стационарная фаза включает средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток, где специфическое связывание средства для отбора с селективным маркером, экспрессированным одной или несколькими Т-клетками, иммобилизует одну или несколько Т-клеток на стационарной фазе; и в пределах 24 часов

от начала инкубации, сбор одной или нескольких Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза содержит по меньшей мере одно из одного или нескольких стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольким Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одно стимулирующее средство представляет собой первое стимулирующее средство, и стационарная фаза дополнительно включает одно или несколько из вторых стимулирующих средств, способных усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал первого стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство представляет собой первое стимулирующее средство, и при этом, до инкубации, добавляют к стационарной фазе стимулирующий реагент, содержащий одно или несколько из вторых стимулирующих средств, способных усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал первого стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство представляет собой первое стимулирующее средство, и при этом, до инкубации, добавляют к стационарной фазе стимулирующий реагент, содержащий одно или несколько из вторых стимулирующих средств, способных усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал первого стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько стимулирующих средств представляет собой первое стимулирующее средство и второе стимулирующее средство, и при этом, до инкубации, добавляют к стационарной фазе стимулирующий реагент, включающий второе стимулирующее средство, способное усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал первого стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, до инкубации, добавляют стимулирующий реагент к стационарной фазе, где указанный стимулирующий реагент содержит по меньшей мере одно из одного или нескольких стимулирующих средств.

[0009] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одно стимулирующее средство представляет собой первое стимулирующее средство, и одно или несколько стимулирующих средств дополнительно содержит одно или несколько из вторых стимулирующих средств, способных усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал первого стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одно из одного или нескольких стимулирующих средств, необязательно, первое стимулирующее средство, является способным доставлять стимулирующий сигнал, где стимулирующий сигнал передается через комплекс TCR/CD3 в Т-клетке, содержащий CD3 комплекс в Т-клетке и/или содержащую ИТАМ молекулу в Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одно из одного или нескольких первых стимулирующих средств является способным доставлять стимулирующий сигнал, где стимулирующий сигнал передается через комплекс TCR/CD3 в Т-клетке, содержащий CD3 комплекс в Т-клетке и/или содержащую ИТАМ молекулу в Т-

клетке. В некоторых вариантах осуществления, второе стимулирующее средство является способным специфически связывать костимулирующую молекулу на одной или нескольких Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления, первое стимулирующее средство доставляет стимулирующий сигнал через комплекс TCR/CD3 в Т-клетке, содержащий CD3 комплекс в Т-клетке и/или содержащую ИТАМ молекулу в Т-клетке, и второе стимулирующее средство связывает костимулирующую молекулу на Т-клетке.

[0010] Настоящее изобретение относится к способам стимуляции на колонке Т-клеток, включающим добавление образца, содержащего множество Т-клеток, к стационарной фазе, где указанная стационарная фаза содержит средство для отбора, которое связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких из множества Т-клеток, таким образом, иммобилизацию одной или нескольких из множества Т-клеток на стационарной фазе; добавление к стационарной фазе стимулирующего реагента, содержащего одно или несколько стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольким из указанного множества Т-клеток, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками; и в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из указанного множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести без добавления конкурентного средства или свободного связывающего средства для элюции множества Т-клеток из стационарной фазы, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

[0011] Настоящее изобретение относится к способам стимуляции на колонке Т-клеток, включающим добавление образца, содержащего множество Т-клеток, к стационарной фазе, где указанная стационарная фаза содержит средство для отбора, которое связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких из множества Т-клеток, таким образом, иммобилизацию одной или нескольких из множества Т-клеток на стационарной фазе; добавление к стационарной фазе стимулирующего реагента, содержащего одно или несколько стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольким из указанного множества Т-клеток, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками; и в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из указанного множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

[0012] Настоящее изобретение относится к способам стимуляции на колонке Т-клеток, включающим инкубацию образца, содержащего множество Т-клеток, на стационарной фазе, где указанная стационарная фаза содержит средство для отбора, которое связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких из множества Т-клеток, таким образом, иммобилизацию одной или нескольких из множества Т-клеток на стационарной фазе, с использованием стимулирующего реагента, содержащего одно или несколько стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольких из указанного множества Т-клеток, таким

образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками; и в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из указанного множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести без добавления конкурентного средства или свободного связывающего средства для элюции множества Т-клеток из стационарной фазы, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

[0013] Настоящее изобретение относится к способам стимуляции на колонке Т-клеток, включающим (1) объединение (а) образца, содержащего множество Т-клеток, и (b) стационарной фазы, содержащей средство для отбора, способное специфически связывать селективный маркер, экспрессированный на поверхности одной или нескольких из множества Т-клеток, где специфическое связывание средства для отбора с селективным маркером вызывает иммобилизацию указанного множества Т-клеток на стационарной фазе; (2) добавление к стационарной фазе стимулирующего реагента, содержащего одно или несколько стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал Т-клеткам, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками; и (3) в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из указанного множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести без добавления конкурентного средства или свободного связывающего средства для элюции множества Т-клеток из стационарной фазы, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

[0014] Настоящее изобретение относится к способам стимуляции на колонке Т-клеток, включающим (1) объединение (а) образца, содержащего множество Т-клеток, и (b) стационарной фазы, содержащей средство для отбора, способное специфически связывать селективный маркер, экспрессированный на поверхности одной или нескольких из множества Т-клеток, где специфическое связывание средства для отбора с селективным маркером иммобилизует указанную одну или несколько из множества Т-клеток на стационарной фазе; (2) добавление к стационарной фазе стимулирующего реагента, содержащего одно или несколько стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал Т-клеткам, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками; и (3) в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из указанного множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

[0015] Настоящее изобретение относится к способам стимуляции на колонке Т-клеток, включающим добавление олигомерного стимулирующего реагента к стационарной фазе, содержащей множество иммобилизованных Т-клеток, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками из множества иммобилизованных Т-клеток, где: стационарная фаза содержит средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток, где специфическое связывание средства для отбора с селективным

маркером, экспрессированным одной или несколькими Т-клетками, вызывает иммобилизацию указанной одной или нескольких Т-клеток на стационарной фазе; и олигомерный стимулирующий реагент содержит (i) множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и (ii) одно или несколько стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольким Т-клеткам, где размер олигомерного стимулирующего реагента включает i) радиус более чем 50 нм, ii) молекулярную массу по меньшей мере 5×10^6 г/моль; и/или (iii) по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина на олигомерный стимулирующий реагент. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает, в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включают, в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести без добавления конкурентного средства или свободного связывающего средства для элюции множества Т-клеток из стационарной фазы, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

[0016] В некоторых вариантах осуществления, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах приблизительно 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 часов от начала инкубации. В некоторых вариантах осуществления, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах приблизительно 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 7-24, 8-24, 9-24, 10-24, 11-24, 12-24, 13-24, 14-24, 15-24, 16-24, 17-24, 18-24, 19-24, 20-24, 21-24, 22-24, 23-24, 2-23, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 или 2-3 часов от начала инкубации. В некоторых вариантах осуществления, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах приблизительно 12, 10, 8, 6, 4 или 2 часов от начала инкубации. В некоторых вариантах осуществления, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах 6 часов от начала инкубации. В некоторых вариантах осуществления, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах 5 часов от начала инкубации. В некоторых вариантах осуществления, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах точно или приблизительно 4,5 часов от начала инкубации. В некоторых вариантах осуществления, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах 4 часов от начала инкубации. В некоторых вариантах осуществления, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах 3 часов от начала инкубации.

[0017] В некоторых вариантах осуществления, начало инкубации со стимулирующим реагентом происходит в пределах точно или приблизительно 10 минут, в

содержащего множество Т-клеток, к стационарной фазе или со стационарной фазой. В некоторых вариантах осуществления, начало инкубации со стимулирующим реагентом происходит в пределах точно или приблизительно 70 минут после добавления или объединения образца, содержащего множество Т-клеток, к стационарной фазе или со стационарной фазой. В некоторых вариантах осуществления, начало инкубации со стимулирующим реагентом происходит в пределах точно или приблизительно 80 минут после добавления или объединения образца, содержащего множество Т-клеток, к стационарной фазе или со стационарной фазой. В некоторых вариантах осуществления, начало инкубации со стимулирующим реагентом происходит в пределах точно или приблизительно 90 минут после добавления или объединения образца, содержащего множество Т-клеток, к стационарной фазе или со стационарной фазой.

[0018] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одно из одного или нескольких стимулирующих средств является способным доставлять стимулирующий сигнал, где стимулирующий сигнал передается через комплекс TCR/CD3 в Т-клетке, содержащий CD3 комплекс в Т-клетке и/или содержащую ИТАМ молекулу в Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одно стимулирующее средство представляет собой первое стимулирующее средство, и стимулирующий реагент дополнительно содержит одно или несколько из вторых стимулирующих средств, способных усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал первого стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, второе стимулирующее средство является способным специфически связывать костимулирующую молекулу на одной или нескольких Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая молекула выбрана среди CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 или HVEM. В некоторых вариантах осуществления, второе стимулирующее средство является способным специфически связывать CD28. В некоторых вариантах осуществления, первое стимулирующее средство специфически связывает CD3, и второе стимулирующее средство специфически связывает CD28.

[0019] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство представляет собой или содержит средство, выбранное из группы, состоящей из фрагментов антител, одновалентных фрагментов антител, белковых связывающих молекул с иммуноглобулиноподобными функциями, молекул, содержащих домены Ig, цитокинов, хемокинов, аптамеров, молекул МНС, комплексов МНС-пептид; лигандов рецепторов; и их связывающих фрагментов; и/или стимулирующее средство содержит фрагмент антитела; стимулирующее средство представляет собой или содержит фрагмент Fab; стимулирующее средство выбрано из группы из двухвалентных фрагментов антител, состоящей из (Fab)₂'-фрагментов и двухвалентных одноцепочечных фрагментов Fv (scFv); стимулирующее средство представляет собой одновалентный фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, фрагментов Fv и scFv; и/или стимулирующее средство представляет собой белковую связывающую молекулу с

антителоподобными связывающими свойствами, выбранную из группы, состоящей из аптамеров, мутеинов на основе полипептида из семейства липокалинов, глутел, белков на основе анкиринового каркаса, белков на основе кристаллинового каркаса, аднектинов и авимеров.

[0020] В некоторых вариантах осуществления, первое и второе стимулирующие средства независимо представляют собой или содержат средство, выбранное из группы, состоящей из фрагментов антител, одновалентных фрагментов антител, белковых связывающих молекул с иммуноглобулиноподобными функциями, молекул, содержащих домены Ig, цитокинов, хемокинов, аптамеров, молекул МНС, комплексов МНС-пептид; лигандов рецепторов; и их связывающих фрагментов; и/или первое и второе стимулирующие средства независимо содержат фрагмент антитела; первое и второе стимулирующие средства независимо представляют собой или содержат фрагмент Fab; первое и второе стимулирующие средства независимо выбраны из группы из двухвалентных фрагментов антител, состоящей из (Fab)₂'-фрагментов и двухвалентных одноцепочечных фрагментов Fv (scFv); первое и второе стимулирующие средства независимо представляют собой одновалентный фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, фрагментов Fv и scFv; и/или первое и второе стимулирующие средства независимо представляют собой белковую связывающую молекулу с антителоподобными связывающими свойствами, выбранную из группы, состоящей из аптамеров, мутеинов на основе полипептида из семейства липокалинов, глутел, белков на основе анкиринового каркаса, белков на основе кристаллинового каркаса, аднектинов и авимеров.

[0021] В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько стимулирующих средств включает одновалентный фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления, первое и второе стимулирующие средства независимо включают одновалентный фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления, первое стимулирующее средство содержит одновалентный фрагмент антитела, связывающий CD3, и второе стимулирующее средство содержит одновалентный фрагмент антитела, связывающий CD28. В некоторых вариантах осуществления, одновалентный фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента Fv и одноцепочечного фрагмента Fv (scFv). В некоторых вариантах осуществления, первый стимулирующий реагент представляет собой Fab против CD3, и второе стимулирующее средство представляет собой Fab против CD28.

[0022] Настоящее изобретение относится к способам стимуляции на колонке Т-клеток, включающим добавление олигомерного стимулирующего реагента, способного доставлять стимулирующий сигнал Т-клеткам, к стационарной фазе, содержащей множество иммобилизованных Т-клеток, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками, где: стационарная фаза содержит средство для отбора, способное специфически связывать селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток или их подгруппы, где специфическое

связывание средства для отбора с селективным маркером, экспрессированным одной или несколькими Т-клетками или их подгруппой, вызывает иммобилизацию указанного по меньшей мере множества Т-клеток на стационарной фазе, и где средство для отбора представляет собой фрагмент Fab, способный специфически связывать селективный маркер, выбранный из группы, состоящей из CD3, CD4 и CD8; олигомерный стимулирующий реагент содержит (i) множество молекул мутеина стрептавидина, (ii) первое стимулирующее средство, способное доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольким Т-клеткам, где первое стимулирующее средство представляет собой фрагмент Fab, способный специфически связывать CD3, и (iii) второе стимулирующее средство, способное усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал, где второе стимулирующее средство представляет собой фрагмент Fab, способный специфически связывать CD28, и где размер олигомерного стимулирующего реагента включает i) радиус более чем 50 нм, ii) молекулярную массу по меньшей мере 5×10^6 г/моль; и/или (iii) по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина на олигомерный стимулирующий реагент; и, в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести без добавления конкурентного средства или свободного связывающего средства для элюции множества Т-клеток из стационарной фазы, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

[0023] В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки происходят из образца, который представляет собой или включает образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), образец нефракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкофереза. В некоторых вариантах осуществления, образец представляет собой продукт афереза или лейкофереза. В некоторых вариантах осуществления, продукт афереза или лейкофереза ранее подвергнут криозамораживанию.

[0024] В некоторых вариантах осуществления, инкубация с одним или несколькими стимулирующими средствами высвобождает одну или несколько из множества иммобилизованных Т-клеток из стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, инкубация с первым и вторым стимулирующими средствами высвобождает одну или несколько из множества иммобилизованных Т-клеток из стационарной фазы.

[0025] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство дополнительно содержит биотин, аналог биотина, который обратимо связывает стрептавидин или авидин, связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWHPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-

Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19), связывающий кальмодулин пептид, который обратимо связывает кальмодулин, пептид FLAG, который обратимо связывает антитело, связывающее пептид FLAG, и олигогистидиновую метку, которая обратимо связывает антитело, связывающее олигогистидиновую метку. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько стимулирующих средств дополнительно содержит связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19). В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько стимулирующих средств дополнительно содержит связывающий стрептавидин пептид, имеющий последовательность SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16).

[0026] В некоторых вариантах осуществления, первое стимулирующее средство и второе стимулирующее средство независимо дополнительно содержат биотин, аналог биотина, который обратимо связывает стрептавидин или авидин, связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19), связывающий кальмодулин пептид, который обратимо связывает кальмодулин, пептид FLAG, который обратимо связывает антитело, связывающее пептид FLAG, и олигогистидиновую метку, которая обратимо связывает антитело, связывающее олигогистидиновую метку. В некоторых вариантах осуществления, каждое из первого и второго стимулирующего средства дополнительно содержит связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19). В некоторых вариантах осуществления, каждое из первого и второго стимулирующего средства дополнительно содержит связывающий

стрептавидин пептид, имеющий последовательность
SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16).

[0027] В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора представляет собой или содержит средство, выбранное из группы, состоящей из фрагментов антител, одновалентных фрагментов антител, белковых связывающих молекул с иммуноглобулиноподобными функциями, молекул, содержащих домены Ig, цитокинов, хемокинов, аптамеров, молекул МНС, комплексов МНС-пептид; лигандов рецепторов; и их связывающих фрагментов; и/или средство для отбора содержит фрагмент антитела; средство для отбора представляет собой или содержит фрагмент Fab; средство для отбора выбрано из группы из двухвалентных фрагментов антител, состоящей из (Fab)₂'-фрагментов и двухвалентных одноцепочечных фрагментов Fv (scFv); средство для отбора представляет собой одновалентный фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, фрагментов Fv и scFv; и/или средство для отбора представляет собой белковую связывающую молекулу с антителоподобными связывающими свойствами, выбранную из группы, состоящей из аптамеров, мутеинов на основе полипептида из семейства липокалинов, глутел, белков на основе анкиринового каркаса, белков на основе кристаллинового каркаса, аднектинов и авимеров.

[0028] В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора дополнительно содержит биотин, аналог биотина, который обратимо связывает стрептавидин или авидин, связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19), связывающий кальмодулин пептид, который обратимо связывает кальмодулин, пептид FLAG, который обратимо связывает антитело, связывающее пептид FLAG, и олигогистидиновую метку, которая обратимо связывает антитело, связывающее олигогистидиновую метку. В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора дополнительно содержит биотин, аналог биотина, который обратимо связывает стрептавидин или авидин, связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19). В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора

дополнительно содержит связывающий стрептавидин пептид, имеющий последовательность SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16).

[0029] В некоторых вариантах осуществления, селективный маркер представляет собой Т-клеточный рецептор; селективный маркер представляет собой или содержит член комплекса Т-клеточного рецептора антигена; селективный маркер представляет собой или содержит цепь CD3; селективный маркер представляет собой или содержит цепь CD3-дзета; селективный маркер представляет собой или содержит CD8; селективный маркер представляет собой или содержит CD4; селективный маркер представляет собой или содержит CD45RA; селективный маркер представляет собой или содержит CD27; селективный маркер представляет собой или содержит CD28; и/или селективный маркер представляет собой или содержит CCR7. В некоторых вариантах осуществления, селективный маркер выбран из группы, состоящей из CD3, CD4 и CD8. В некоторых вариантах осуществления, селективный маркер представляет собой CD3.

[0030] В некоторых вариантах осуществления, специфическое связывание между средством для отбора и селективным маркером не индуцирует сигнал, или не индуцирует стимулирующий или активирующий или пролиферативный сигнал, для Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора включает одновалентный фрагмент антитела, связывающий CD3, CD8 или CD4. В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора представляет собой Fab против CD3, Fab против CD8 или Fab против CD4. В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора представляет собой Fab против CD3. В некоторых вариантах осуществления, Fab против CD3 содержит фрагмент Fab антитела ОКТ3. В некоторых вариантах осуществления, Fab против CD3 содержит переменную тяжелую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:31, и переменную легкую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:32.

[0031] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент является растворимым. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент не является растворимым и не является связанным с или ассоциированным с твердой подложкой, стационарной фазой, бусиной, микрочастицей, магнитной частицей и/или матриксом; и/или реагент является гибким, не содержит металлический или магнитный кор, состоит полностью или преимущественно из органического мультимера, не является сферическим, не является по существу сферическим или единообразным по форме, и/или не является жестким. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент представляет собой или содержит стрептавидин, авидин, мутеин стрептавидина, который обратимо связывает биотин, аналог биотина или его биологически активный фрагмент; мутеин авидина или стрептавидина, который обратимо связывает связывающий стрептавидин пептид; реагент, который содержит по меньшей мере две хелатирующие группы К, где по меньшей мере две хелатирующие группы являются способными связывать ион переходного металла; средство, способное связывать олигогистидиновую аффинную метку; средство, способное связывать глутатион-S-трансферазу; кальмодулин

или его аналог; средство, способное связывать связывающий кальмодулин пептид (CBP); средство, способное связывать FLAG-пептид; средство, способное связывать HA-метку; средство, способное связывать связывающий мальтозу белок (MBP); средство, способное связывать эпитоп HSV; средство, способное связывать эпитоп тус; или средство, способное связывать биотинилированный белок-носитель.

[0032] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент представляет собой или содержит мутеин стрептавидина или мутеин авидина, который обратимо связывает биотин или биологически активный фрагмент; стимулирующий реагент представляет собой или содержит мутеин стрептавидина или мутеин авидина, который обратимо связывает аналог биотина или биологически активный фрагмент; и/или стимулирующий реагент представляет собой или содержит мутеин стрептавидина или мутеин авидина, который обратимо связывает связывающий стрептавидин пептид.

[0033] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент представляет собой олигомерный стимулирующий реагент, содержащий множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, где размер частицы олигомерного стимулирующего реагента включает i) радиус более чем 50 нм, ii) молекулярную массу по меньшей мере 5×10^6 г/моль; и/или (iii) по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина на частицу олигомерного стимулирующего реагента. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент является растворимым. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент не является растворимым, и не является связанным с или ассоциированным с твердой подложкой, стационарной фазой, бусиной, микрочастицей, магнитной частицей и/или матриксом; и/или реагент является гибким, не содержит металлический или магнитный кор, состоит полностью или преимущественно из органического мультимера, и/или не является жестким.

[0034] В некоторых вариантах осуществления, молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина обратимо связывают или являются способными обратимо связывать биотин, аналог биотина или связывающий стрептавидин пептид. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность Va144-Thr45-Ala46-Arg47 или Pc44-Gly45-Ala46-Arg47 в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47, со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:1; или мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность Va144-Thr45-Ala46-Arg47 в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47, со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, связывающий стрептавидин пептид выбран из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-

Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19).

[0035] В некоторых вариантах осуществления, частица олигомерного реагента имеет радиус более чем 60 нм, более чем 70 нм, более чем 80 нм, или более чем 90 нм. В некоторых вариантах осуществления, частица олигомерного реагента имеет радиус между 50 нм и 150 нм, между 75 нм и 125 нм, между 80 нм и 115 нм, или между 90 нм и 110 нм, включительно; или радиус 90 нм ±15 нм, или 95 нм±20-25 нм. В некоторых вариантах осуществления, радиус представляет собой гидродинамический радиус.

[0036] В некоторых вариантах осуществления, частица олигомерного реагента имеет молекулярную массу по меньшей мере 5×10^7 г/моль или по меньшей мере 1×10^8 г/моль; и/или между 5×10^7 г/моль и 5×10^8 г/моль, между 1×10^8 г/моль и 5×10^8 г/моль или между 1×10^8 г/моль и 2×10^8 г/моль. В некоторых вариантах осуществления, частица олигомерного реагента содержит по меньшей мере 500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере 1000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере 1500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, или по меньшей мере 2000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина; и/или; между 1000 и 20000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, между 1000 и 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, или между 2000 и 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент добавляют к стационарной фазе в концентрации между приблизительно 1 и приблизительно 2 мкг/1 миллион клеток.

[0037] В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора связано, напрямую или опосредованно, со стационарной фазой. В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора связано опосредованно со стационарной фазой посредством реагента для отбора, с которым средство для отбора обратимо связывается. В некоторых вариантах осуществления, реагент для отбора представляет собой или содержит стрептавидин, авидин, мутеин стрептавидина, который обратимо связывает биотин, аналог биотина или его биологически активный фрагмент; мутеин авидина или стрептавидина, который обратимо связывает связывающий стрептавидин пептид; реагент, который содержит по меньшей мере две хелатирующие группы К, где по меньшей мере две хелатирующие группы являются способными связывать ион переходного металла; средство, способное связывать олигогистидиновую аффинную метку; средство, способное связывать глутатион-S-трансферазу; кальмодулин или его аналог; средство, способное связывать связывающий кальмодулин пептид (CBP); средство, способное связывать FLAG-пептид; средство, способное связывать HA-метку; средство, способное связывать связывающий мальтозу белок (MBP); средство, способное связывать эпитоп HSV; средство, способное связывать эпитоп тус; или средство, способное связывать биотинилированный белок-носитель. В некоторых вариантах осуществления, реагент для

отбора представляет собой или содержит мутеин стрептавидина или мутеин авидина, который обратимо связывает биотин или биологически активный фрагмент; стимулирующий реагент представляет собой или содержит мутеин стрептавидина или мутеин авидина, который обратимо связывает аналог биотина или биологически активный фрагмент; и/или стимулирующий реагент представляет собой или содержит мутеин стрептавидина или мутеин авидина, который обратимо связывает связывающий стрептавидин пептид. В некоторых вариантах осуществления, молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина обратимо связывают или являются способными обратимо связывать биотин, аналог биотина или связывающий стрептавидин пептид.

[0038] В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность Va144-Thr45-Ala46-Arg47 или Pe44-Gly45-Ala46-Arg47 в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47, со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:1; или мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность Va144-Thr45-Ala46-Arg47 в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47, со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, связывающий стрептавидин пептид выбран из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), SAWSHQPFEKGGGSGGGSGGSAWSHQPFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHQPFEKGGGSGGGSGGGSWSHQPFEK (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19). В некоторых вариантах осуществления, связывающий стрептавидин пептид имеет последовательность SAWSHQPFEKGGGSGGGSGGSAWSHQPFEK (SEQ ID NO:16).

[0039] В некоторых вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем описании, осуществляют при точно или приблизительно 37°C. В некоторых вариантах осуществления, указанный сбор включает промывку стационарной фазы средами, не содержащими конкурентное средство или свободное связывающее средство, для элюции Т-клеток из стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, сбор под действием силы тяжести включает добавление к стационарной фазе сред, не содержащих конкурентное средство или свободное связывающее средство для элюции Т-клеток из стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, указанная композиция, содержащая стимулированные Т-клетки, не содержит конкурентное средство или свободное связывающее средство. В некоторых вариантах осуществления, указанное конкурентное средство или свободное связывающее средство представляет собой или содержит биотин или аналог биотина, необязательно где аналог биотина представляет собой D-биотин. В некоторых вариантах осуществления, конкурентное средство или свободное связывающее средство представляет собой D-биотин. В некоторых вариантах

осуществления, способ включает, после указанного сбора, дополнительную инкубацию композиции, содержащей стимулированные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, дополнительную инкубацию проводят при точно или приблизительно $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$; и/или дополнительную инкубацию проводят в присутствии дополнительного средства, способного доставлять сигнал Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное средство содержится в средах, используемых для промывки стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное средство является способным усиливать или индуцировать пролиферацию Т-клеток, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное средство представляет собой цитокин, выбранный среди IL-2, IL-15 и IL-7. В некоторых вариантах осуществления, дополнительную инкубацию проводят в течение времени, составляющего 72 часа, не более чем 48 часов, не более чем 24 часа или не более чем 12 часов.

[0040] В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты в стимулированные Т-клетки из композиции, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует рекомбинантный белок, таким образом, получение композиции, содержащей трансдуцированные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный белок представляет собой рецептор антигена. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный белок представляет собой химерный рецептор антигена.

[0041] В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена (CAR) содержит внеклеточный узнающий антиген домен, который специфически связывает антиген-мишень, и внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен содержит внутриклеточный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ). В некоторых вариантах осуществления, дополнительно включен трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный передающий сигналы домен. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен дополнительно содержит внутриклеточный передающий сигналы домен из Т-клеточной костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточная костимулирующая молекула выбрана из группы, состоящей из CD28 и 41BB. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей рекомбинантный рецептор антигена.

[0042] В некоторых вариантах осуществления, введение рекомбинантной нуклеиновой кислоты осуществляют посредством трансдукции с использованием вирусной частицы. В некоторых вариантах осуществления, вирусная частица представляет собой частицу ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления, вирусная частица представляет собой частицу лентивирусного вектора.

[0043] В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает инкубацию композиции, содержащей трансдуцированные клетки, в условиях для интеграции вируса, необязательно, при температуре точно или приблизительно $37^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию композиции, содержащей трансдуцированные клетки, проводят в течение вплоть до 96 часов после введения. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию композиции, содержащей трансдуцированные клетки, проводят в течение вплоть до 72 часов после введения. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию композиции, содержащей трансдуцированные клетки, проводят в течение вплоть до 48 часов после введения. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию композиции, содержащей трансдуцированные клетки, проводят в течение вплоть до 24 часов после введения. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию композиции, содержащей трансдуцированные клетки, проводят в течение по меньшей мере 18 часов после введения.

[0044] В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает культивирование композиции, содержащей трансдуцированные клетки, в условиях для интеграции вируса, таким образом, получение композиции, содержащей культивированные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает культивирование композиции, содержащей трансдуцированные клетки, в условиях для размножения Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, культивирование проводят в течение времени, составляющего не более чем 14 суток, не более чем 12 суток, не более чем 10 суток, не более чем 8 суток или не более чем 6 суток. В некоторых вариантах осуществления, не более чем 5 суток.

[0045] В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает сбор модифицированных Т-клеток, таким образом, получение выходной популяции модифицированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает сбор модифицированных Т-клеток на время между 48 и 120 часов, включительно, после начала воздействия стимулирующего реагента. В некоторых вариантах осуществления, сбор проводят в пределах 120 часов после начала воздействия стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, сбор проводят в пределах 96 часов после начала воздействия стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, сбор проводят в пределах 72 часов после начала воздействия стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, сбор проводят в пределах 48 часов после начала воздействия стимулирующего средства.

[0046] В некоторых вариантах осуществления, на время сбора, процент подобных наивным клеток составляет более чем или более чем приблизительно 60% среди тотальных Т-клеток в популяции, тотальных CD4+ Т-клеток в популяции или тотальных CD8+ Т-клеток, или экспрессирующих рекомбинантный белок клеток из них, в популяции. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки содержат CD27+CCR7+ клетки.

[0047] В некоторых вариантах осуществления, введение проводят в бессывороточных средах. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в бессывороточных средах. В некоторых вариантах осуществления, при этом культивирование проводят в бессывороточных средах. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит 0,5 мМ-5 мМ дипептидную форму L-глутамин в основных средах; 0,5 мМ-5 мМ L-глутамин; и необязательно, по меньшей мере один белок, где среда не содержит сыворотку. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит рекомбинантный цитокин, выбранный среди IL-2, IL-15 и IL-7, необязательно, рекомбинантный человеческий IL-2, рекомбинантный человеческий IL-15 и/или рекомбинантный человеческий IL-7. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда не содержит рекомбинантный цитокин, выбранный среди IL-2, IL-15 и IL-7, необязательно, рекомбинантный человеческий IL-2, рекомбинантный человеческий IL-15 и/или рекомбинантный человеческий IL-7.

[0048] В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает инкубацию композиции, содержащей трансдуцированные клетки. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение точно или приблизительно 24 часов±6 часов, 48 часов±6 часов, или 72 часов±6 часов.

[0049] В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства к композиции, содержащей стимулированные T-клетки, таким образом, разрушение обратимой связи(связей). В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства к композиции, содержащей трансдуцированные T-клетки, таким образом, разрушение обратимой связи(связей). В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства к композиции, содержащей культивированные T-клетки, таким образом, разрушение обратимой связи(связей). В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства к композиции, содержащей модифицированные клетки, необязательно, трансдуцированные T-клетки, необязательно, где средство добавляют в условиях для диссоциации одного или нескольких стимулирующих средств от олигомерного стимулирующего реагента в композиции. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства к композиции, содержащей инкубированные T-клетки, необязательно, в условиях для диссоциации одного или нескольких стимулирующих средств от олигомерного стимулирующего реагента в композиции. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства к композиции, содержащей культивированные T-клетки, необязательно, в условиях для диссоциации одного или нескольких стимулирующих

средств от олигомерного стимулирующего реагента в композиции. В некоторых вариантах осуществления, добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства проводят до сбора.

[0050] В некоторых вариантах осуществления, конкурентное средство или свободное связывающее средство не является вредным для Т-клеток и/или при этом добавление указанного вещества не уменьшает процент выживания Т-клеток до менее чем 90%, 80%, 70%, 60% или 50%, по сравнению с инкубацией Т-клеток, в сравнимых или таких же условиях, в отсутствие конкурентного средства или свободного связывающего средства. В некоторых вариантах осуществления, указанное разрушение прекращает или уменьшает стимулирующий сигнал в Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления, конкурентный реагент и свободное связывающее средство независимо содержат молекулу из группы, состоящей из: связывающих стрептавидин молекул; биотина; D-биотина; аналогов биотина; аналогов биотина, которые специфически связывают стрептавидин или аналог стрептавидина, имеющий аминокислотную последовательность Val144-Thr45-Ala46-Arg47 или Ile44-Gly45-Ala46-Arg47 в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47 стрептавидина дикого типа; или конкурентный реагент и свободное связывающее средство независимо содержат хелатор металла, который, необязательно, представляет собой EDTA или EGTA. В некоторых вариантах осуществления, конкурентное средство или свободное связывающее средство представляет собой D-биотин, необязательно 1 мМ D-биотин. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает промывку клеток, необязательно, где промывка приводит к уменьшению количества или удалению стимулирующего реагента и/или одного или нескольких стимулирующих средств в композиции. В некоторых вариантах осуществления, промывку проводят до сбора.

[0051] В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки содержат антигенспецифические Т-клетки или их популяцию, Т-клетки-помощники или их популяцию, цитотоксические Т-клетки или их популяцию, Т-клетки памяти или их популяцию, или регуляторные Т-клетки или их популяцию. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки содержат CD3+ Т-клетки или содержат CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

[0052] В некоторых вариантах осуществления, способ включает отбор подгруппы Т-клеток из стимулированных Т-клеток из композиции до введения, где рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты вводят в отобранную подгруппу Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, способ включает отбор подгруппы Т-клеток из композиции, содержащей трансдуцированные клетки, до инкубации, где отобранную подгруппу Т-клеток инкубируют в условиях для интеграции вируса. В некоторых вариантах осуществления, способ включает отбор подгруппы Т-клеток из композиции, содержащей модифицированные клетки, до культивирования, где отобранную подгруппу Т-клеток культивируют в условиях для размножения Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, способ включает отбор подгруппы Т-клеток из композиции, содержащей

модифицированные клетки, до сбора, где отобранную подгруппу Т-клеток собирают для получения выходной популяции модифицированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, подгруппа Т-клеток представляет собой подобные наивным Т-клетки или представляет собой Т-клетки, поверхность которых является положительной по маркеру, экспрессированному на подобных наивным Т-клетках, представляющие собой CCR7+CD45RA+, CD27+CCR7+ или CD62L-CCR7+. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки содержат CD27+CCR7+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки содержат CCR7+CD45RA+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, при этом подгруппа Т-клеток экспрессирует рекомбинантный белок, необязательно, химерный рецептор антигена. В некоторых вариантах осуществления, отбор подгруппы Т-клеток проводят посредством аффинной хроматографии на колонке.

[0053] В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает составление собранных клеток для криоконсервации и/или введения субъекту, необязательно, в присутствии фармацевтически приемлемого наполнителя. В некоторых вариантах осуществления, собранные клетки составляют в присутствии криопротектора. В некоторых вариантах осуществления,

[0054] В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза представляет собой или содержит хроматографический матрикс. В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза имеет емкость связывания, необязательно, емкость статического связывания или емкость динамического связывания, между приблизительно 75 миллионов и приблизительно 125 миллионов Т-клеток на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, (а) стационарная фаза составляет приблизительно 20 мл; и/или (б) стационарная фаза имеет емкость связывания 2 миллиарда±0,5 миллиардов клеток. В некоторых вариантах осуществления, способ включает две стационарные фазы. В некоторых вариантах осуществления, две стационарные фазы аранжированы параллельно. В некоторых вариантах осуществления, при этом две стационарные фазы аранжированы последовательно.

[0055] Настоящее изобретение относится к изделиям для стимуляции Т-клеток на колонке, содержащим первое стимулирующее средство и второе стимулирующее средство, способное специфически связывать первую молекулу и вторую молекулу, соответственно, на поверхности Т-клетки, таким образом, стимулировать Т-клетку; и стационарную фазу, содержащую средство для отбора, способное специфически связывать селективный маркер на Т-клетке, таким образом, иммобилизовать Т-клетку на стационарной фазе. В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза дополнительно содержит первое стимулирующее средство и второе стимулирующее средство. В некоторых вариантах осуществления, первое стимулирующее средство, второе стимулирующее средство и средство для отбора связаны опосредованно со стационарной фазой посредством реагента для отбора. В некоторых вариантах осуществления, изделие дополнительно включает стимулирующий реагент, где первое и

второе стимулирующие средства являются обратимо связанными или способными к обратимому связыванию. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент представляет собой олигомерный стимулирующий реагент. В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора связано опосредованно со стационарной фазой посредством реагента для отбора.

[0056] В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза представляет собой или включает хроматографический матрикс, и при этом изделие дополнительно содержит контейнер, в котором содержится весь или часть хроматографического матрикса. В некоторых вариантах осуществления, изделие включает две стационарные фазы. В некоторых вариантах осуществления, две стационарные фазы аранжированы параллельно. В некоторых вариантах осуществления, при этом две стационарные фазы аранжированы последовательно.

[0057] Настоящее изобретение относится к устройству, включая изделия и варианты их осуществления. В некоторых вариантах осуществления, устройство дополнительно содержит впускное отверстие для жидкости, соединенное, с возможностью переноса жидкости, с одним или несколькими компонентами устройства, и/или выпускное отверстие для жидкости, соединенное, с возможностью переноса жидкости, с одним или несколькими компонентами устройства. В некоторых вариантах осуществления, устройство находится в закрытой или стерильной системе. В некоторых вариантах осуществления, система представляет собой закрытую и стерильную систему.

[0058] Настоящее изобретение относится к устройству и/или изделиям для использования в любом из способов, представленных в настоящем описании, включая варианты их осуществления, где способ, необязательно, осуществляют автоматизированным образом.

Краткое описание чертежей

[0059] На **ФИГ. 1** представлено схематическое представление иллюстративного варианта осуществления для стимуляции и отбора клеток-мишеней, в котором стимуляцию проводят посредством инкубации клеток, которая происходит, по меньшей мере частично, в присутствии подложки, **6**, изображенной в данном случае как стационарная фаза, имеющей иммобилизованные на ней компонент(ы) реагента для отбора **1**, для отбора клеток (панель А), который имеет участок связывания для средства для отбора **2**, которое является способным связывать молекулу (селективный маркер) **4**, присутствующую на некоторых или всех клетках-мишенях. Средство для отбора **2** добавляют к подложке с иммобилизованным реагентом для отбора **1**, в условиях, посредством которых реагент и средство обратимо связываются, например, посредством участков связывания, образуя олигомерный комплекс с средством, мультимеризованным на нем (панель В). Средство для отбора может включать более чем одно средство. Альтернативно, обратимо связанный комплекс средства и реагента можно добавлять к стационарной фазе в качестве комплекса для иммобилизации. Как показано, клетки **3**, включая клетки-мишени, объединяют со стационарной фазой и комплексом

мультимеризованного средства для отбора, в результате чего клетки-мишени становятся обратимо иммобилизованными на подложке **6**, посредством средства для отбора **2** и реагента (реагента для отбора) **1** (панель С). Необязательно, не связанные клетки удаляют, либо до добавления стимулирующих средств, либо после этого. Комплекс, содержащий мультимеризованные стимулирующие средства **5**, обратимо связанные с олигомерным стимулирующим реагентом **7**, добавляют в условиях, посредством которых стимулирующее средство **5** специфически связывает молекулу на клетках-мишенях, таким образом, индуцируя или модулируя сигнал в иммобилизованных клетках-мишенях, экспрессирующих маркер (панель D).

[0060] На **ФИГ. 2А и 2В** показаны результаты метаболического анализа WST Т-клеток от трех различных доноров, инкубированных с антителами против CD3/против CD28, мультимеризованными на различных партиях олигомерных реагентов. На **ФИГ. 2А** обобщена метаболическая активность WST для всех тестируемых партий (пулированных), по сравнению с эталонными партиями, содержащими антитела против CD3/против CD28, мультимеризованные на олигомерном остоле, с средним гидродинамическим радиусом 36 нм или 101 нм. Средняя метаболическая активность WST среди Т-клеток от различных доноров для индивидуально тестируемых партий и эталонных реагентов показана на **ФИГ. 2В**.

[0061] На **ФИГ. 3** показаны эффекты 24-часовой стимуляции на колонке с использованием олигомерного стимулирующего реагента против CD3/против CD28 на поверхностную экспрессию CD3, CD4 и CD8, когда соответствующую молекулу использовали в качестве селективного маркера для иммобилизации клеток на стационарной фазе хроматографической колонки. Паттерны поверхностной экспрессии сравнивают с контрольными условиями, не включающими стимуляцию на колонке с использованием олигомерного стимулирующего реагента против CD3/против CD28. Клетки выделяли из образца после афереза, нанесенного на стационарную фазу.

[0062] На **ФИГ. 4** показана иллюстративная кинетика понижающей регуляции и повторной экспрессии комплекса TCR/CD3 при стимуляции на колонке с использованием олигомерного стимулирующего реагента против CD3/против CD28, когда CD3 использовали в качестве селективного маркера для иммобилизации клеток на колонке. Клетки выделяли из образца после афереза, нанесенного на стационарную фазу. Антитело против альфа-бета-цепей TCR использовали для оценки комплекса CD3/TCR.

[0063] На **ФИГ. 5А-5В** показаны фенотипические и функциональные характеристики культивированных Т-клеток, которые спонтанно откреплялись в ходе стимуляции на колонке с использованием олигомерного стимулирующего реагента против CD3/против CD28. На **ФИГ. 5А** показан размер Т-клетки, и экспрессия CD3, CD69 и CD25 через 24 часа и 5 суток после стимуляции на колонке. На **ФИГ. 5В** показана пролиферативная способность спонтанно открепленных культивированных Т-клеток. Клетки выделяли из образца после афереза, нанесенного на стационарную фазу, и собирали с использованием стадии промывки.

[0064] На **ФИГ. 6А-6D** показаны иллюстративные эффекты инкубации Т-клеток с использованием олигомерного стимулирующего реагента против CD3/против CD28 в присутствии/или отсутствии соединения 63 на передачу сигналов mTog и жизнеспособность, и кинетику роста. На **ФИГ. 6А** показана экспрессия pS6 в живых CD8+ Т-клетках по подгруппе клеток памяти. На **ФИГ. 6В** показана средняя интенсивность флуоресценции (mfi) тотальных CD8 Т-клеток по обработке, как указано. На **ФИГ. 6С-6D** показана жизнеспособность и общее количество Т-клеток, соответственно, с течением времени (как показано посредством суток; d1 и т.д.) в культуре после начала стимуляции («ввод»).

[0065] На **ФИГ. 7А-7F** показаны иллюстративные функциональные и фенотипические свойства криоконсервированных CAR-Т-клеток, полученных с использованием способов, в которых используют инкубацию с использованием олигомерного стимулирующего реагента против CD3/против CD28 в присутствии/или в отсутствие соединения 63. На **ФИГ. 7А** показана внутриклеточная экспрессия каспазы на время размораживания. На **ФИГ. 7В и 7D** показаны фенотипические профили CD8-CAR-Т-клеток и CD4-CAR-Т-клеток, соответственно, по подгруппам экспрессии CD27 и/или CCR7. На **ФИГ. 7С и 7Е** показаны внутриклеточный IL2, IFN γ или TNF (левые панели) или комбинации IL2 и/или IFN γ или TNF (правые панели) среди CD8-CAR-Т-клеток и CD4-CAR-Т-клеток, соответственно, стимулированных с использованием несущих антиген мишеней. На **ФИГ. 7F** показаны размножение и выживаемость в течение 12 суток (левая панель), и суммарный показатель размножения, рассчитанный по площади под кривой (правая панель) для CAR-Т-клеток, стимулированных с использованием бусин против CAR.

[0066] На **ФИГ. 8А** показаны выходы CD3+, CD4+ и CD8+ Т-клеток после отбора клеток с использованием либо способа стимуляции на колонке, либо альтернативного способа, описанного в примере 5. На **ФИГ. 8В-8С** показано общее количество клеток (**ФИГ. 8В**) и процент живых клеток (**ФИГ. 8С**), выделенных после использования либо способа стимуляции на колонке, либо альтернативного способа, описанного в примере 5.

[0067] На **ФИГ. 9А-9D** показаны процент живых клеток (например, чистота; **ФИГ. 9А**), процент живых клеток, экспрессирующих иллюстративный CAR (**ФИГ. 9В**), процент живых клеток, экспрессирующих CD4 при отборе и на сутки 8 процесса (**ФИГ. 9С**), и распределения фенотипов Т-клеток (процент) для каждого донора (**ФИГ. 9D**) на сутки 5 в культуре (сутки 8 от начала процесса), либо для способа стимуляции на колонке, либо для альтернативного способа, описанного в примере 5.

[0068] На **ФИГ. 10** показан лизис CD19+ клеток НЕК с течением времени в ходе культивирования Т-клеток с CAR против CD19, модифицированных с использованием либо способа стимуляции на колонке, либо альтернативного способа, как описано в примере 5, и контрольных условиях.

[0069] На **ФИГ. 11А-11С** показана продукция Т-клетками с антигенспецифическим CAR IFN γ (**ФИГ. 11А**), IL-2 (**ФИГ. 11В**) и TNF-а (**ФИГ. 11С**) для CD4 и CD8 Т-клеток,

модифицированных с использованием либо способа стимуляции на колонке, либо альтернативного способа, описанного в примере 5.

[0070] На **ФИГ. 12А-12С** показано соотношение CD4:CD8 (ФИГ. 12А), эффективность трансдукции модифицированных Т-клеток (объединенных CD4 и CD8 клеток; ФИГ. 12В) и процент жизнеспособных клеток (ФИГ.12С), полученных с использованием либо способа стимуляции на колонке, либо альтернативного способа, описанного в примере 5. Показаны три цикла промышленного получения для каждого способа.

[0071] На **ФИГ. 13** показан размер опухоли по среднему излучению среди групп обработки через 6 суток после инъекции (i.v.) мышам линии клеток В-клеточной лимфомы (Raji).

[0072] На **ФИГ. 14** показана опухолевая нагрузка у мышей, подвергнутых инъекции линии клеток В-клеточной лимфомы (Raji), с течением времени для каждой группы обработки. Эффекты обработки CAR-Т-клетками показаны либо для способа стимуляции на колонке, либо для альтернативного способа, описанного в примере 5, и для каждого из трех циклов промышленного получения (см. ФИГ. 12А-12С).

Подробное описание

[0073] Настоящее изобретение относится к способам отбора клеток из образца, содержащего клетки-мишени (например, Т-клетки, CD3+, CD4+, CD8+ Т-клетки), и иммобилизации указанных клеток-мишеней на стационарной фазе хроматографической колонки, стимуляции иммобилизованных клеток на стационарной фазе (также обозначенной в настоящем описании как стимуляция на колонке), и сбора и/или элюции отобранных и стимулированных клеток, которые спонтанно открепляются от стационарной фазы, без использования конкурентных средств или свободных связывающих средств для облегчения открепления. Среди представленных способов присутствуют способы, включающие отбор клеток из образца, содержащего клетки-мишени (например, Т-клетки, CD3+, CD4+, CD8+ Т-клетки), и иммобилизацию указанных клеток-мишеней на стационарной фазе хроматографической колонки, стимуляцию иммобилизованных клеток на стационарной фазе, и сбор и/или элюцию отобранных и стимулированных клеток под действием силы тяжести. В представленных вариантах осуществления, стимуляция клеток-мишеней (например, CD3+, CD4+ или CD8+ Т-клеток) на стационарной фазе хроматографической колонки облегчает понижающую регуляцию молекулы, используемой для отбора клеток (т.е., селективного маркера), что приводит к спонтанному откреплению или высвобождению клетки из стационарной фазы. Высвобождение или открепление клеток может происходить без каких-либо дополнительных стадий или реагентов. В некоторых аспектах, клетки можно собирать под действием силы тяжести, например, посредством добавления среды или другого раствора в хроматографическую колонку. В конкретных вариантах осуществления, среда или другой раствор, который добавляют, не содержит конкурентные средства или свободные связывающие средства для облегчения открепления клеток из стационарной фазы.

[0074] В некоторых вариантах осуществления, отобранные и стимулированные клетки представляют собой композицию, содержащую стимулированные Т-клетки, в которой Т-клетки отобраны из биологического образца (например, образца после афереза или образца цельной крови), содержащего множество Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, сбор и/или элюцию отобранных и стимулированных клеток, которые спонтанно открепляются от стационарной фазы, осуществляют под действием силы тяжести, например, в ходе стадии промывки. Способы, представленные в настоящем описании, объединяют стадии отбора, стимуляции и сбора и/или элюции клеток, и не требуют отдельных стадий для облегчения открепления отобранных и стимулированных клеток от стационарной фазы и стадий очистки для удаления средств (например, конкурентных средств и/или свободных связывающих средств), используемых для облегчения открепления. Таким образом, в способах уменьшено количество стадий переработки, необходимых для получения композиции отобранных и стимулированных клеток, пригодной для нижестоящей переработки (например, генетической инженерии, размножения, последующей инкубации, стимуляции и/или отбора (например, начального отбора и/или окончательной очистки)), таким образом, с уменьшением времени промышленного получения, минимизацией потенциального стресса клеток и уменьшением потенциала контаминации.

[0075] В конкретных вариантах осуществления, способами получают выходную композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах 24 часов. В конкретных вариантах осуществления, способами получают выходную композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах точно или приблизительно 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 часов. В конкретных вариантах осуществления, способами получают выходную композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах точно или приблизительно 6, 5, 4, 3 или 2 часов. В некоторых вариантах осуществления, способами получают выходную композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах или в пределах менее чем приблизительно 6 часов. В некоторых вариантах осуществления, способами получают выходную композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах или в пределах менее чем приблизительно 5,5 часов. В некоторых вариантах осуществления, способами получают выходную композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах или в пределах менее чем приблизительно 5 часов. В некоторых вариантах осуществления, способами получают выходную композицию отобранных и

стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах или в пределах менее чем приблизительно 4,5 часов. В некоторых вариантах осуществления, способами получают выходную композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах или в пределах менее чем приблизительно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, способами получают выходную композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах или в пределах менее чем приблизительно 3 часов. В некоторых вариантах осуществления, способами получают выходную композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах или в пределах менее чем приблизительно 3-6 часов. В некоторых вариантах осуществления, способами получают выходную композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах или в пределах менее чем приблизительно 4-6 часов. В некоторых вариантах осуществления, способами получают выходную композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах или в пределах менее чем приблизительно 5-6 часов. В некоторых вариантах осуществления, способами получают выходную композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах или в пределах менее чем приблизительно 4-5 часов. В некоторых вариантах осуществления, способами, представленными в настоящем описании, получают композицию модифицированных Т-клеток (например, терапевтическую композицию клеток) в пределах 5 суток. В некоторых вариантах осуществления, способами, представленными в настоящем описании, получают композицию модифицированных Т-клеток (например, терапевтическую композицию клеток) за точно или приблизительно 4-5 суток. В некоторых вариантах осуществления, в результате стадий, представленных в настоящем описании, получают производственный процесс, имеющий длительность точно или приблизительно 4 или 5 суток. В некоторых вариантах осуществления, в результате стадий, представленных в настоящем описании, получают производственный процесс, имеющий длительность приблизительно 4-5 суток. В некоторых вариантах осуществления, в результате стадий, представленных в настоящем описании, получают производственный процесс, имеющий длительность точно или приблизительно 4 суток, или имеющий длительность 96 ± 6 часов.

[0076] Представленные способы включают способы отбора клеток, например, CD3+, CD4+ и CD8+ Т-клеток, из других компонентов, например, из других клеток в образце, и иммобилизации клеток на стационарной фазе хроматографической колонки; стимуляции отобранных клеток, иммобилизованных на стационарной фазе; и сбора

отобранных и стимулированных клеток в отсутствие стадий переработки для открепления клеток от стационарной фазы и удаления средств (например, конкурентных средств и/или свободных связывающих средств), используемых для облегчения указанного открепления, из выходной композиции отобранных и стимулированных клеток. В конкретных вариантах осуществления, представленные способы включают способы отбора клеток, например, CD3+, CD4+ и CD8+ Т-клеток, из других компонентов, например, из других клеток в образце, и иммобилизации клеток на стационарной фазе хроматографической колонки; стимуляции отобранных клеток, иммобилизованных на стационарной фазе; и элюции и/или сбора отобранных и стимулированных клеток под действием силы тяжести.

[0077] В конкретных аспектах, представленные способы являются улучшенными по сравнению с многими существующими способами получения модифицированных клеток (например, Т-клеток), например, для клеточной терапии, которые включают одну или несколько дополнительных стадий после отбора клеток (например, отбора на основании иммуноаффинности) до стимуляции клеток. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько дополнительных стадий, присутствующих в существующих способах, могут включать стадию или стадии элюции с использованием конкурентного реагента или свободного связывающего средства для выделения или сбора отобранных клеток, и/или стадии удаления реагентов, используемых в отборе (например, реагентов на магнитных бусинах или антител). В некоторых вариантах осуществления, такие дополнительные стадии могут удлинять процесс модификации клеток для клеточной терапии и/или могут приводить к манипуляциям с клетками в ходе процесса, которые могут влиять на их состояние дифференцировки, жизнеспособность или количество клеток. В конкретных аспектах, представленными способами получают популяции отобранных и стимулированных клеток за более короткий промежуток времени, по сравнению со способами, включающими отдельные стадии отбора и стимуляции и требующими дополнительных стадий для открепления клеток из стационарной фазы и удаления средств, используемых для облегчения открепления.

[0078] В конкретных аспектах, способами получают выходную популяцию отобранных и стимулированных клеток (также обозначенную как выходная композиция), пригодную для нижестоящей переработки (например, генетической инженерии, размножения, и/или последующих циклов инкубации, стимуляции и/или отбора (например, окончательной очистки)), в пределах 24 часов от начала стимуляции на колонке, также обозначенной в настоящем описании как стимуляция-на-колонке. В некоторых вариантах осуществления, способами получают выходную популяцию отобранных и стимулированных клеток (например, выходную композицию), пригодную для нижестоящей переработки (например, генетической инженерии, размножения, и/или последующих циклов инкубации, стимуляции и/или отбора (например, окончательной очистки)), в пределах точно или приблизительно 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 часов от начала стимуляции на колонке. В некоторых вариантах осуществления, способами получают выходную популяцию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для

стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки (например, генетической инженерии, размножения, и/или последующих циклов инкубации, стимуляции и/или отбора (например, окончательной очистки)), в пределах точно или приблизительно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, способами получают выходную популяцию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки (например, генетической инженерии, размножения, и/или последующих циклов инкубации, стимуляции и/или отбора (например, окончательной очистки)), в пределах точно или приблизительно 3 часов.

[0079] В некоторых вариантах осуществления, способы включают использование стимулирующих средств, способных связывать молекулы на поверхности клеток, таким образом, доставку стимулирующего сигнала клетке. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие средства содержатся в олигомерном стимулирующем реагенте (например, олигомере мутеина стрептавидина, конъюгированном с Fab против CD3 и против CD28), который можно добавлять к стационарной фазе. В некоторых вариантах осуществления, стимуляция приводит к спонтанному откреплению отобранных клеток от стационарной фазы, таким образом, позволяя сбор и/или элюцию отобранных и стимулированных клеток в отсутствие дополнительных стадий переработки для открепления клеток от стационарной фазы и удаления средств, используемых для облегчения указанного открепления, из выходной композиции стимулированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, стимуляция приводит к спонтанному откреплению или высвобождению отобранных клеток из стационарной фазы, таким образом, позволяя сбор и/или элюцию отобранных и стимулированных клеток под действием силы тяжести. В некоторых вариантах осуществления, полагаются на силу тяжести для сбора или элюции спонтанно открепленных клеток из колонки (например, стационарной фазы). В некоторых вариантах осуществления, стадию промывки, например, в комбинации с силой тяжести, можно использовать для элюции спонтанно открепленных клеток из колонки (например, стационарной фазы). В некоторых вариантах осуществления, стадия промывки может включать просто добавление культуральных сред (например, бессывороточных сред) в колонку, например, таких же сред, какие присутствуют во входной композиции клеток до добавления или иммобилизации клеток на стационарной фазе. В конкретных аспектах, способами успешно получают неконтаминированную (например, не содержащую средств, используемых для открепления (например, конкурентных средств, свободных связывающих средств) и/или средств для отбора) композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для дальнейшей переработки, например, генетической инженерии, размножения, инкубации, или последующих циклов стимуляции и/или отбора (например, окончательной очистки), в пределах 24 часов от начала стимуляции на колонке. Настоящее изобретение относится также к изделиям и устройству для этого

[0080] Различные способы доступны для получения популяций клеток, пригодных для использования в клеточной терапии (например, отобранных (обогащенных) и

стимулированных популяций клеток, модифицированных для экспрессии рекомбинантных белков (например, химерных рецепторов антигенов)). Однако, в некоторых аспектах, эти способы могут требовать длительного или относительно длительного периода времени для получения клеток, по меньшей мере частично, из-за необходимости проведения множества стадий переработки. Множество стадий переработки могут также приводить к клеточному стрессу, таким образом влияя на полезность клеток в нижестоящей переработке. Необходимы дополнительные способы получения композиций клеток.

[0081] В конкретных аспектах, представленные способы основаны на наблюдениях, что отбор и стимуляция клеток-мишеней (например, CD3+, CD4+ или CD8+ Т-клеток) на стационарной фазе хроматографической колонки, где стимуляция способствует понижающей регуляции молекулы, используемой для отбора клеток (т.е., селективного маркера), приводит к спонтанному откреплению клеток от стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, стационарную фазу хроматографической колонки функционализируют с использованием средства (например, средства для отбора), способного специфически связывать молекулу (например, селективный маркер) на поверхности клетки-мишени. Таким образом, при объединении образца, содержащего клетки-мишени, содержащие селективный маркер (например, CD3, CD4, CD8), со стационарной фазой (например, добавлении образца к стационарной фазе), клетки-мишени (например, CD3+, CD4+, CD8+ Т-клетки) опосредованно иммобилизуют на стационарной фазе. В конкретных аспектах, клетки-мишени (например, Т-клетки) стимулируют во время иммобилизации на стационарной фазе (например, стимуляции на колонке), например, посредством добавления стимулирующих средств, стимулирующих реагентов, содержащих стимулирующие средства, и/или посредством стимулирующих средств, связанных напрямую или опосредованно со стационарной фазой. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующие средства включают средства, которые активируют или стимулируют Т-клетки, такие как средства на основе антитела против CD3/против CD28 (например, Fab). Таким образом, в некоторых аспектах, представленные способы и другие варианты осуществления обеспечивают те преимущества, что они сводят вместе множество стадий переработки (например, отбора и стимуляции) и/или исключают стадии переработки (например, стадии удаления реагентов для отбора и/или средств, используемых для облегчения открепления) и позволяют сводить вместе процесс для проведения в одном и том же контейнере и/или закрытой системе, что может обеспечивать увеличенную эффективность и стерильность.

[0082] В конкретных аспектах, способы включают использование олигомерных стимулирующих реагентов, содержащих стимулирующие средства, способные доставлять стимулирующий сигнал клетке-мишени (например, Т-клетке). Иллюстративные олигомерные реагенты включают олигомеры мутеина стрептавидина, которые являются обратимо связанными или конъюгированными с одним или несколькими антителами или их фрагментами, способными доставлять стимулирующий сигнал клетке-мишени,

например, Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент представляет собой олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированный с Fab против CD3 и против CD28. Существующие реагенты для использования в стимуляции Т-клеток *in vitro*, например, в отсутствие экзогенных факторов роста или при низких количествах экзогенных факторов роста, известны (см., например, Патент США 6352694 В1 и Европейский патент EP 0 700 430 В1). Как правило, в таких реагентах можно использовать бусины, например, магнитные бусины, более чем 1 мкм в диаметре, на которых различные связывающие средства (например, антитело против CD3 и/или антитело против CD28) иммобилизованы. Однако, в некоторых случаях, такие магнитные бусины, например, сложно интегрировать в способы стимуляции клеток в условиях, требуемых для клинических исследований или для терапевтических целей, поскольку необходимо удостовериться, что эти магнитные бусины по существу или полностью удалены до введения модифицированных Т-клеток субъекту. В некоторых аспектах, такое удаление, например, посредством воздействия на клетки магнитного поля, может уменьшать выход жизнеспособных клеток, доступных для клеточной терапии. В конкретных случаях, такие реагенты, например, стимулирующие реагенты, содержащие магнитные бусины, необходимо инкубировать с клетками в течение минимального количества времени, чтобы позволять достаточный уровень открепления Т-клеток от стимулирующего реагента. Кроме того, реагенты такие как бусины, не являются легко совместимыми с хроматографией на колонке из-за физических ограничений.

[0083] Представленные способы, использующие олигомерные стимулирующие реагенты (например, олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированный с антителами против CD3 и против CD28, такими как Fab), преодолевают такие потенциальные ограничения. Например, в некоторых вариантах осуществления, представленные способы включают добавление растворимого олигомерного реагента, не связанного с твердой подложкой (например, бусиной), со стационарной фазой для инициации стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы могут включать стадии для уменьшения или минимизации количества остаточного олигомерного стимулирующего реагента, который может присутствовать в конце общего процесса модификации клеток для клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, риск присутствия остаточного реагента в выходных клетках, например, модифицированных клетках, полученных или продуцированных способами, уменьшают или исключают посредством использования олигомерного реагента, поскольку добавление конкурентного реагента или свободного связывающего средства можно использовать для диссоциации (например, нарушения связывания) олигомерных стимулирующих реагентов от стимулирующих средств в композиции, содержащей клетки. В некоторых вариантах осуществления, это также может являться достаточным для уменьшения количества или удаления олигомерного стимулирующего реагента из клеток в композиции посредством одной или нескольких стадии промывки, например, без необходимости добавления

конкурентного реагента или свободного связывающего средства, поскольку олигомерный стимулирующий реагент является растворимым. В некоторых вариантах осуществления, это также означает, что способ, соответствующий стандартам GMP, можно разрабатывать более просто, по сравнению с другими способами, такими как способы, где необходимо предпринимать дополнительные меры, чтобы убедиться, что конечная популяция для введения не содержит бусин. Таким образом, в некоторых аспектах, удаление или отделение олигомерного стимулирующего реагента из клеток, например, посредством добавления конкурентного средства или свободного связывающего средства, или посредством одной или нескольких стадий промывки, приводит к небольшой потере клеток или отсутствию потери клеток, по сравнению с удалением или отделением стимулирующих реагентов на основе бусин. В некоторых аспектах, расписание уменьшения количества, удаления или отделения стимулирующего реагента или олигомерного стимулирующего реагента не является ограниченным или является менее ограниченным, чем удаление или отделение стимулирующих реагентов на основе бусин. Таким образом, в некоторых аспектах, можно осуществлять уменьшение количества, удаление или отделение стимулирующего реагента или олигомерного стимулирующего реагента от клеток в любой момент времени/или на любой стадии в ходе представленных способов.

[0084] В конкретных аспектах, длительность представленных способов можно измерять от момента, когда клетки, например, Т-клетки из входной популяции клеток или образца, сначала приводят в контакт или подвергают воздействию стимулирующих условий (например, как описано в настоящем описании, например, в разделе I-C), обозначенного альтернативно в настоящем описании как начало инкубации со стимулирующим средством или в стимулирующих условиях, например, как когда начинают воздействие стимулирующего реагента. В некоторых вариантах осуществления, длительность времени для сбора выходной популяции (также обозначенной в настоящем описании как выходная композиция), содержащей стимулированные клетки-мишени (например, CD3+, CD4+, CD8+ Т-клетки) измеряют от начала инкубации клеток-мишеней со стимулирующим реагентом (например, добавления стимулирующего реагента или воздействия стимулирующего реагента), т.е., когда стимулирующий реагент добавляют в колонку. В некоторых вариантах осуществления, сбор проводят под действием силы тяжести клеток из колонки через некоторое время после начала инкубации, что, в некоторых случаях, может включать одну или несколько промывок колонки для обеспечения выделения спонтанно высвобожденных клеток из колонки. В конкретных вариантах осуществления, длительность инкубации до сбора клеток из колонки составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 24 часа, 23 часа, 22 часа, 21 час, 20 часов, 19 часов, 18 часов, 17 часов, 16 часов, 15 часов, 14 часов, 13 часов, 12 часов, 11 часов, 10 часов, 9 часов, 8 часов, 7 часов, 6 часов, 5 часов, 4 часа, 3 часа или 2 часа. В некоторых вариантах осуществления, длительность инкубации до элюции и/или сбора клеток из колонки, составляет, составляет приблизительно или составляет менее

чем 12 часов, 11 часов, 10 часов, 9 часов, 8 часов, 7 часов, 6 часов, 5 часов, 4 часа, 3 часа или 2 часа. В некоторых вариантах осуществления, длительность инкубации до элюции и/или сбора клеток из колонки, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 6 часов, 5 часов, 4 часа, 3 часа или 2 часа. В некоторых вариантах осуществления, длительность инкубации до элюции и/или сбора клеток из колонки составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 6 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность инкубации до элюции и/или сбора клеток из колонки, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 5 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность инкубации до элюции и/или сбора клеток из колонки, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 4,5 часа. В некоторых вариантах осуществления, длительность инкубации до элюции и/или сбора клеток из колонки, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 4 часа. В некоторых вариантах осуществления, длительность инкубации до элюции и/или сбора клеток из колонки, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 3 часа. В некоторых вариантах осуществления, длительность инкубации до элюции и/или сбора клеток из колонки составляет между точно или приблизительно 3-6 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность инкубации до элюции и/или сбора клеток из колонки составляет между точно или приблизительно 4-6 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность инкубации до элюции и/или сбора клеток из колонки составляет между точно или приблизительно 4-5 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность представленной инкубации со стимулирующим реагентом до сбора из колонки, например, для получения выходной композиции отобранных и стимулированных клеток для использования в сочетании с генетически модифицированными клетками с рекомбинантным рецептором, например, посредством трансдукции, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 75%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 15% или 10% от альтернативных или существующих процессов, таких как альтернативные процессы, в которых отбор и стимуляцию проводят по отдельности, и/или в которых стимуляцию не проводят на колонке.

[0085] По настоящему изобретению, предусмотрено, что выходные композиции отобранных и стимулированных клеток можно далее перерабатывать. Например, выходные клетки можно генетически модифицировать для экспрессии рекомбинантного белка, такого как химерный рецептор антигена, и/или выходные клетки можно подвергнуть дальнейшей инкубации, стимуляции, размножению, отбору (например, окончательной очистке) и/или составлению. В некоторых вариантах осуществления, выходную композицию отобранных и стимулированных клеток можно далее перерабатывать (например, модифицировать, окончательно очищать) для получения выходной композиции модифицированных клеток, например, терапевтической композиции клеток, которую можно использовать для лечения заболевания у пациента.

[0086] В конкретных вариантах осуществления, представленные способы осуществляют для образцов, например, таких как образец после афереза, образец

лейкоцитарной пленки/или образец цельной крови. В некоторых вариантах осуществления, образцы представляют собой биологические образцы. В некоторых вариантах осуществления, биологические образцы собирают от субъектов-людей. В некоторых вариантах осуществления, биологические образцы собирают от пациентов, страдающих заболеванием или состоянием. В некоторых вариантах осуществления, способы осуществляют для популяций клеток, например, CD3+ Т-клеток, которые ранее выделяли, обогащали или отбирали из образца. В некоторых вариантах осуществления, способы осуществляют для популяций клеток, например, CD4+ и CD8+ Т-клеток, которые ранее выделяли, обогащали или отбирали из образца. В некоторых вариантах осуществления, образец или клетки, выделенные из образца, могли быть криоконсервированы.

[0087] Настоящее изобретение относится также к клеткам и популяциям, полученным способами, включая фармацевтические популяции и составы, и наборы, системы и устройства для осуществления способов. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам использования клеток и популяций, полученных способами, включая терапевтические способы, например, способы адаптивной клеточной терапии, и фармацевтические популяции для введения субъектам.

[0088] 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.

[0089] Заголовки разделов, используемые в настоящем описании, приведены только с целью организации, и их не следует рассматривать как ограничивающие описанный объект.

I. СПОСОБЫ ОТБОРА, СТИМУЛЯЦИИ И МОДИФИКАЦИИ КЛЕТОК

[0090] Настоящее изобретение относится к способам получения выходной популяции клеток (также обозначенной как выходная композиция), таких как отобранные и стимулированные Т-клетки, например, CD3+ Т, CD4+ Т и CD8+ Т-клетки, включая стадии отбора, стимуляции и сбора клеток. В некоторых вариантах осуществления, выходная популяция стимулированных и отобранных клеток является пригодной для получения терапевтической композиции клеток. В конкретных аспектах, способ объединяет стадии отбора и стимуляции, что позволяет сбор и/или элюцию отобранных и стимулированных клеток, которые спонтанно открепляются от стационарной фазы, без использования конкурентных средств или свободных связывающих средств для облегчения открепления. Таким образом, способы, представленные в настоящем

описании, объединяют стадии отбора, стимуляции, и сбора/элюции клеток, и не требуют отдельных стадий для облегчения открепления отобранных и стимулированных клеток из стационарной фазы и стадий очистки для удаления средств (например, конкурентных средств и/или свободных связывающих средств), используемых для облегчения открепления. Таким образом, в способах уменьшено количество стадий переработки, необходимых для получения выходной композиции отобранных и стимулированных клеток, пригодной для нижестоящей переработки (например, генетической инженерии, размножения, последующей инкубации, стимуляции и/или отбора (например, окончательной очистки)), таким образом, с уменьшением времени промышленного получения, минимизацией потенциального стресса клеток и уменьшением потенциала контаминации. В конкретных вариантах осуществления, способами получают композицию отобранных и стимулированных клеток, пригодную для нижестоящей переработки в пределах установленного количества времени, например, в пределах 24 часов. В некоторых вариантах осуществления, выходная популяция отобранных и стимулированных клеток использована в качестве входной популяции, или является источником для использования в качестве входной популяции, для последующих стадий, например, генетической инженерии, как описано в разделе I-E.

[0091] В конкретных вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем описании, используют в сочетании с промышленным получением, получением или продукцией препарата для клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, способы получения или продукции выходной композиции, например, отобранных и стимулированных Т-клеток, включают одну или несколько стадий для выделения клеток от субъекта, инкубации клеток в стимулирующих условиях. В некоторых аспектах, выходную композицию используют в качестве источника входных клеток для дальнейших нижестоящих процессов для продукции препарата для клеточной терапии, например, для генетической модификации клеток. В некоторых вариантах осуществления, способ включает стадии переработки, проводимые в порядке, в котором клетки, например, первичные CD3+, CD4+ и CD8+ Т-клетки, выделяют, например, отбирают или отделяют, из биологического образца и инкубируют в стимулирующих условиях и собирают или элюируют за одну стадию, и впоследствии генетически модифицируют для введения рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в клетки, например, посредством трансдукции или трансфекции; и затем накапливают, собирают или заполняют в контейнер, например, пакет или флакон, в качестве выходной популяции модифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки из выходной популяции модифицированных клеток (например, терапевтической композиции клеток) повторно вводят тому же субъекту, необязательно, после криоконсервирования и хранения клеток. В некоторых вариантах осуществления, выходные популяции модифицированных клеток являются пригодными для использования в терапии, например, аутологичной клеточной терапии.

[0092] В конкретных вариантах осуществления, представленные способы используют в сочетании с получением выходной популяции модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, из начальной или входной популяции клеток. В конкретных вариантах осуществления, входную популяцию продуцируют, получают и/или изготавливают посредством предоставления, объединения, смешивания и/или пулирования клеток, собранных в качестве выходной композиции отобранных и стимулированных клеток посредством представленных способов. В некоторых вариантах осуществления, входная популяция клеток содержит обогащенные Т-клетки, обогащенные CD3+ Т-клетки, обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки (далее в настоящем описании также обозначенные как популяции обогащенных Т-клеток, популяции обогащенных CD3+ Т-клеток, популяции обогащенных CD4+ Т-клеток и популяции обогащенных CD8+ Т-клеток, соответственно). В некоторых вариантах осуществления, входная популяция клеток представляет собой популяцию CD4+ или CD8+ Т-клеток, или представляет собой объединенную, смешанную, и/или пулированную популяцию CD4+ и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления входная популяция клеток представляет собой популяцию CD3+ клеток. В конкретных вариантах осуществления, представленные способы используют в сочетании с генетической инженерией отобранных и стимулированных клеток, например, для введения полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок, посредством трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления, способы можно использовать для выделения или отбора клеток и стимуляции клеток из биологического образца (например, образца цельной крови, образца после афереза), например, из биологического образца, взятого, собранного и/или полученного от субъекта, для получения входной популяции обогащенных Т-клеток, которые были стимулированы. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы могут дополнительно включать сбор, накопление и/или составление популяции обогащенных Т-клеток после того, как клетки были модифицированы, трансдуцированы и/или культивированы.

[0093] В конкретных вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем описании, осуществляют в связи с введением гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида в клетки, например, трансдукцией или трансфекцией клеток, например, способом, описанным в настоящем описании, например, в разделе I-E. В конкретных вариантах осуществления представленных способов, клетки инкубируют либо во время, либо после генетической инженерии клеток, например, в течение периода времени, достаточного, чтобы позволить интеграцию гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок, или чтобы позволить экспрессию рекомбинантного белка. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в течение установленного или фиксированного количества времени, такого как количество времени более чем 18 часов или менее чем 4 суток. В некоторых вариантах осуществления, стадию модификации начинают или иницируют в пределах установленного количества времени от момента, когда стимуляцию начинают или

инициируют, например, в пределах 24 часов от момента, когда клетки подвергают воздействию стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, стадию модификации начинают или инициируют в пределах точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 часов от момента, когда клетки подвергают воздействию стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, стадию модификации начинают или инициируют в пределах точно или приблизительно 2, 3, 4, 5 или 6 часов от момента, когда клетки подвергают воздействию стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, стадию модификации начинают или инициируют в пределах точно или приблизительно 3 или 6 часов от момента, когда клетки подвергают воздействию стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, стадию модификации начинают или инициируют в пределах точно или приблизительно 4 или 6 часов от момента, когда клетки подвергают воздействию стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, стадию модификации начинают или инициируют в пределах точно или приблизительно 4 или 5 часов от момента, когда клетки подвергают воздействию стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, стадию модификации начинают или инициируют в пределах точно или приблизительно 6 часов от момента, когда клетки подвергают воздействию стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, стадию модификации начинают или инициируют в пределах точно или приблизительно 5 часов от момента, когда клетки подвергают воздействию стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, стадию модификации начинают или инициируют в пределах точно или приблизительно 4,5 часов от момента, когда клетки подвергают воздействию стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, стадию модификации начинают или инициируют в пределах точно или приблизительно 4 часов от момента, когда клетки подвергают воздействию стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, стадию модификации начинают или инициируют в пределах точно или приблизительно 3 часов от момента, когда клетки подвергают воздействию стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, инкубация в присутствии гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, необязательно, где гетерологичный или рекомбинантный полинуклеотид содержится в вирусе (например, вирусном векторе), длится в течение точно, приблизительно или по меньшей мере 1 час. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько стадий способа проводят, по меньшей мере частично, в бессывороточных средах. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой культуральную среду определенного или точно определенного состава. В конкретных вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой контролируемую культуральную среду, которая была переработана, например, фильтрована, для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит белки. В конкретных вариантах осуществления, бессывороточная среда может содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы прикрепления. В

некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда включает цитокины. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда включает цитокины или рекомбинантные цитокины. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда включает рекомбинантные IL-2, IL-15 и/или IL-7. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда включает глутамин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда включает глутамин и рекомбинантные IL-2, IL-15 и IL-7.

[0094] В некоторых вариантах осуществления, представленные способы осуществляют таким образом, что одну, несколько или все стадии получения клеток для клинического использования, например, в адоптивной клеточной терапии, проводят без подвергания клеток воздействию нестерильных условий. В некоторых вариантах осуществления, клетки отбирают, стимулируют, трансдуцируют, промывают и составляют, все внутри закрытой, стерильной системы или устройства. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько из стадий проводят вне закрытой системы или устройства. В некоторых таких вариантах осуществления, клетки переносят наружу закрытой системы или устройства в стерильных условиях, например, посредством стерильного переноса в отдельную закрытую систему.

[0095] В конкретных вариантах осуществления, образец и/или выделенные части образца, такого как образец, содержащий клетки, в связи с одной или несколькими стадиями способа (например, лейкоцитарную пленку, популяции обогащенных Т-клеток), можно собирать, составлять для криозащиты, подвергать замораживанию (например, криозащите) и/или хранить ниже 0°C, ниже -20°C или при или ниже -7°C или -80°C до, во время или после любой стадии или ступени способов, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, клетки можно хранить в течение количества времени менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 суток, или количества времени менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 недель, или в течение количества времени по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель, или в течение более чем 8 недель. После хранения, образец клеток или выделенную часть образца можно размораживать и перерабатывать в соответствии со способом, который можно возобновлять с той же самой точки в процессе. В конкретных вариантах осуществления, культивированные и/или составленные популяции обогащенных Т-клеток (например, модифицированные Т-клетки) подвергают криозащите и хранят перед введением субъекту, например, в качестве аутологичной клеточной терапии.

[0096] В конкретных вариантах осуществления, на любой стадии или ступени в способе, из части клеток можно отбирать образцы или собирать ее, например, клетки можно отбирать из популяции клеток (такой как популяция Т-клеток), в то время как популяция остается в закрытой системе. В конкретных вариантах осуществления, такие клетки можно анализировать по маркерам, признакам или характеристикам, включая, но без ограничения, жизнеспособность, апоптоз, активацию, стимуляцию, рост и/или истощение. В некоторых вариантах осуществления, образцы клеток отбирают, или клетки

собирают посредством автоматизированного способа (см., например, раздел I-E-3a). В некоторых вариантах осуществления, анализ образцов или собранных клеток является автоматизированным. В конкретных вариантах осуществления, анализ проводят в закрытой системе в стерильных условиях.

[0097] В некоторых вариантах осуществления, клетки или популяции клеток которые получают и/или перерабатывают посредством представленных способов, можно сравнивать с клетками или популяциями клеток, переработанными или полученными посредством иллюстративного и/или альтернативного способа. В конкретных вариантах осуществления, альтернативный и/или иллюстративный способ может отличаться в одном или нескольких конкретных аспектах, но в ином отношении имеет сходные или одинаковые признаки, аспекты, ступени, стадии, реагенты или условия из варианта осуществления или аспекта представленных способов, которые сравнивают с иллюстративным или альтернативным способом. Например, отобранные и стимулированные клетки, полученные посредством представленных способов, например, выходную композицию отобранных и стимулированных клеток, можно сравнивать с клетками, полученными с использованием способа, включающего отдельные стадии отбора и стимуляции, требующие использования конкурентного средства или свободного связывающего средства для открепления отобранных клеток от стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, если не указано иное, представленные способы и иллюстративный или альтернативный способ могут являться в ином отношении сходными и/или идентичными, например, со сходными или идентичными стадиями отбора, обогащения, стимуляции, модификации, трансфекции, трансдукции, культивирования и/или составления. В некоторых вариантах осуществления, если не указано иное, представленными способами и альтернативным способом отбирают и/или обогащают клетки из одинаковых или сходных типов биологических образцов, и/или перерабатывают клетки и/или входные клетки такого же типа клеток.

[0098] Способами, представленными в настоящем описании, уменьшают количество времени, необходимое для получения выходной композиции модифицированных клеток (например, терапевтической композиции клеток). В некоторых вариантах осуществления, количество времени, необходимое для получения выходной композиции модифицированных клеток (например, терапевтической композиции клеток), по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, или 90% меньше, чем время, необходимое для альтернативного способа. В некоторых вариантах осуществления, способами, представленными в настоящем описании, получают выходную композицию модифицированных клеток (например, терапевтическую композицию клеток) менее чем за 5 суток. В некоторых вариантах осуществления, способами, представленными в настоящем описании, получают выходную композицию модифицированных клеток (например, терапевтическую композицию клеток) за точно или приблизительно 4 суток или за точно или приблизительно 96 часов. В некоторых вариантах осуществления, способами, представленными в настоящем описании, получают выходную композицию

модифицированных клеток (например, терапевтическую композицию клеток) за точно или приблизительно 4-5 суток или за точно или приблизительно 96-120 часов, включительно.

А. Получение образцов и клеток

[0099] В конкретных вариантах осуществления, представленные способы включают отбор и/или обогащение клеток из биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы включают отбор клеток или их популяций из биологических образцов, таких как образцы, полученные или происходящие от субъекта, такого как субъект, имеющий конкретное заболевание или состояние, или необходимость в клеточной терапии, или субъект, которого планируют подвергать клеточной терапии. В некоторых аспектах, субъект представляет собой человека, такого как субъект, представляющий собой пациента, 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. Образцы включают ткань, жидкость и другие образцы, отобранные непосредственно у субъекта. Биологический образец может представлять собой образец, полученный непосредственно из биологического источника, или образец, подвергнутый переработке. Биологические образцы включают, но без ограничения, жидкости организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая происходящие из них переработанные образцы.

[0100] В некоторых аспектах, образец представляет собой кровь или происходящий из крови образец, или представляет собой продукт или получен из продукта афереза или лейкофереза. Иллюстративные образцы включают цельную кровь, моноклеарные клетки периферической крови (РВМС), лейкоциты, костный мозг, тимус, биоптат ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, ассоциированную с кишечником лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистой оболочкой лимфоидную ткань, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, ободочную кишку, почку, поджелудочную железу, молочную железу, кость, предстательную железу, шейку матки, яички, яичники, миндалину или другой орган, и/или происходящие из него клетки. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологических и аллогенных источников.

[0101] В некоторых примерах, клетки из циркулирующей крови субъекта получены, например, посредством афереза или лейкофереза. Образцы, в некоторых аспектах, содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и/или тромбоциты, и, в некоторых аспектах, содержат клетки, отличные от эритроцитов и тромбоцитов.

[0102] 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.

[0103] В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки (например, продукт афереза или продукт лейкофереза), промывают для удаления одного или нескольких антикоагулянтов, таких как гепарин, добавленных в ходе афереза или лейкофереза.

[0104] В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки (например, образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), образец нефракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкофереза) подвергают криоконсервации и/или криозащите (например, замораживанию) и затем размораживают перед любыми стадиями выделения, отбора, активации, стимуляции, модификации, трансдукции, трансфекции, инкубации, культивирования, сбора, составления популяции клеток и/или введения составленной популяции клеток субъекту.

[0105] В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий аутологичные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от субъекта, собирают способом, пригодным для обеспечения соответствующего количества для промышленного получения. В одном аспекте образец, содержащий PBMC, получают из фракционированной цельной крови. В некоторых вариантах осуществления, цельную кровь от субъекта фракционируют посредством лейкофереза с использованием центробежного ускорения и с использованием различий плотности между клеточными фенотипами, когда аутологичные мононуклеарные клетки (MNC) предпочтительно обогащают, в то время как другие клеточные фенотипы, такие как эритроциты, уменьшают в собранной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, аутологичную плазму одновременно собирают в ходе сбора MNC, что, в некоторых аспектах, может обеспечивать продленную стабильность продукта лейкофереза. В одном аспекте, аутологичную плазму добавляют к продукту лейкофереза для улучшения буферной емкости матрикса продукта лейкофереза. В некоторых аспектах, общий объем

цельной крови, переработанный для получения продукта лейкофереза, составляет точно или приблизительно 2 л, 4 л, 6 л, 8 л, 10 л, 12 л, 14 л, 16 л, 18 л или 20 л, или составляет любое значение между любыми из вышеуказанных. В некоторых вариантах осуществления, объем собранной аутологичной плазмы составляет точно или приблизительно 10 мл, 50 мл, 100 мл, 150 мл, 200 мл, 250 мл или 300 мл, или более, или представляет собой объем между любыми из вышеуказанных. В некоторых вариантах осуществления, продукт лейкофереза подвергают некоторой процедуре, например, промывке и составлению для криоконсервации в ходе процесса, в пределах приблизительно 48 часов после завершения сбора продукта лейкофереза. В некоторых вариантах осуществления, продукт лейкофереза подвергают одну или несколько стадий промывки, например, в пределах приблизительно 2 часов, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов, или 48 часов после завершения сбора продукта лейкофереза. В некоторых аспектах, одна или несколько стадий промывки удаляет антикоагулянт в ходе сбора продукта лейкофереза, клеточные отходы, которые могут накапливаться в продукте лейкофереза, остаточные тромбоциты и/или клеточный дебрис. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько замен буфера проводят в ходе одной или нескольких стадий промывки.

[0106] В конкретных вариантах осуществления, продукт афереза или продукт лейкофереза подвергают криоконсервации и/или криозащите (например, замораживанию) и затем размораживают перед подверганием стадии отбора или выделения клеток (например, стадии отбора или выделения Т-клеток), как описано ниже. В некоторых вариантах осуществления, после того, как подвергнутый криоконсервации и/или криозащите продукт афереза или продукт лейкофереза подвергнут стадии отбора или выделения Т-клеток, дополнительных стадий криоконсервации и/или криозащиты не проводят во время или между любыми из последующих стадий, таких как стадии активации, стимуляции, модификации, трансдукции, трансфекции, инкубации, культивирования, сбора, составления популяции клеток и/или введения составленной популяции клеток субъекту. Например, Т-клетки, отобранные из размороженного подвергнутого криоконсервации и/или криозащите продукта афереза или продукта лейкофереза, снова не подвергают криоконсервации и/или криозащите перед размораживанием для нижестоящего процесса, такого как трансдукция.

[0107] В конкретных вариантах осуществления, подвергнутый криоконсервации и/или криозащите продукт афереза или продукт лейкофереза помещают в банк (например, без отбора клеток до заморозки образца), что, в некоторых аспектах, может обеспечивать большую гибкость для последующих стадий промышленного получения. В некоторых аспектах, подвергнутый криоконсервации и/или криозащите продукт афереза или продукт лейкофереза аликвотируют в множество контейнеров для криоконсервации, таких как пакеты, каждый из которых, индивидуально или в комбинации, можно использовать в переработке продукта. В одном аспекте помещение клеток в банк до отбора увеличивает выходы клеток для нижестоящего процесса, и помещение клеток в банк раньше может

означать, что они являются более здоровыми и могут лучше соответствовать критериям успеха промышленного получения. В другом аспекте, после размораживания, подвергнутый криоконсервации и/или криозащите продукт афереза или продукт лейкофереза можно подвергать одному или нескольким различным способам отбора. Преимуществами этого способа являются, среди прочего, улучшение доступности, эффективности, и/или других аспектов клеток из клеточной терапии для лечения заболевания или состояния субъекта, например, у донора образца и/или другого реципиента.

[0108] В некоторых вариантах осуществления, образец (например, образец после афереза или лейкофереза) собирают и подвергают криоконсервации и/или криозащите до или без предшествующего отбора клеток (например, без предшествующего отбора Т-клеток, такого как отбор посредством хроматографии), в момент времени, после того как у донора диагностируют заболевание или состояние. В некоторых аспектах, время криоконсервации также наступает до того, как донора подвергают одному или нескольким из следующего: любого начального лечения заболевания или состояния, любого целевого лечения или любого лечения, назначенного для лечения заболевания или состояния, или любого лечения, отличного от радиоактивного облучения и/или химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления, образец собирают после первого рецидива заболевания после начального лечения заболевания, и до того, как донора или субъекта подвергают последующему лечению заболевания. Начальное и/или последующее лечение могут представлять собой терапию, отличную от клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, собранные клетки можно использовать в клеточной терапии после начального и/или последующего лечения. В одном аспекте, подвергнутый криоконсервации и/или криозащите образец без предшествующего отбора клеток может способствовать уменьшению первоначальных затрат, таких как затраты, ассоциированные с не поддающимися лечению пациентами в рандомизированном клиническом исследовании, которые могут осуществлять перекрестный переход и требовать лечения позже.

[0109] В некоторых вариантах осуществления, образец (например, образец после афереза или лейкофереза) собирают и подвергают криоконсервации и/или криозащите до или без предшествующего отбора клеток (например, без предшествующего отбора Т-клеток, такого как отбор посредством хроматографии), в момент времени, после второго рецидива заболевания после второй линии лечения заболевания, и до того как донора или субъекта подвергают последующее лечение заболевания. В некоторых вариантах осуществления, пациентов идентифицируют, как имеющих вероятность рецидива после второй линии лечения, например, посредством оценки конкретных факторов риска. В некоторых вариантах осуществления, факторы риска основаны на типе и/или генетике заболевания, такого как лимфома с двойной мутацией, первичная невосприимчивая злокачественная опухоль или активированная В-клеточная лимфома. В некоторых вариантах осуществления, факторы риска основаны на клиническом проявлении, таком

как ранний рецидив после первой линии лечения, или другие плохие прогностические показатели после лечения (например, IPI (Международный прогностический индекс) > 2).

[0110] В некоторых вариантах осуществления, образец (например, образец после афереза или лейкофереза) собирают и подвергают криоконсервации и/или криозащите до или без предшествующего отбора клеток (например, без предшествующего отбора Т-клеток, такого как отбор посредством хроматографии), в момент времени до того как у донора или субъекта диагностируют заболевание. В некоторых аспектах, донор или субъект может быть определен как имеющий риск развития заболевания. В некоторых аспектах, донор или субъект может представлять собой здорового субъекта. В конкретных случаях, донор или субъект может принять решение поместить клетки в банк или на хранение без подразумеваемого риска развития заболевания или наличия диагноза заболевания, на случай, если клеточная терапия потребуется в более поздний период жизни. В некоторых вариантах осуществления, для донора или субъекта могут подразумевать риск развития заболевания, на основании таких факторов, как генетические мутации, генетические аномалии, генетические нарушения, семейный анамнез, белковые аномалии (такие как недостаточность белковой продукции и/или процессинга) и выбор образа жизни, который может увеличивать риск развития заболевания. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают в качестве профилактического средства.

[0111] В некоторых вариантах осуществления, подвергнутый криоконсервации и/или криозащите образец клеток (например, образец после афереза или лейкофереза), такой как образец клеток, который не подвергали предшествующему отбору клеток (например, без предшествующего отбора Т-клеток, такого как отбор посредством хроматографии), помещают на хранение или в банк, на период времени, больший или равный 12 часов, 24 часа, 36 часов или 48 часов. В некоторых вариантах осуществления, образец помещают на хранение или в банк на период времени, больший или равный 1 неделя, 2 недели, 3 недели или 4 недели. В некоторых вариантах осуществления, образец подвергают длительному хранению или длительному помещению в банк. В некоторых аспектах, образец хранят в течение периода времени, большего или равного 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года, 4 года, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет, 10 лет, 11 лет, 12 лет, 13 лет, 14 лет, 15 лет, 16 лет, 17 лет, 18 лет, 19 лет, 20 лет, 25 лет, 30 лет, 35 лет, 40 лет или более.

[0112] В некоторых вариантах осуществления, образец после афереза или лейкофереза, полученный от донора, транспортируют в условиях охлаждения в отдел для хранения или переработки, и/или подвергают криогенному хранению в отделе для хранения или перерабатывают в отделе для переработки. В некоторых вариантах осуществления, до транспортировки, образец перерабатывают, например, посредством отбора Т-клеток, таких как CD4+ и/или CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, такую переработку проводят после транспортировки и до криогенного

хранения образца. В некоторых вариантах осуществления, переработку проводят после разморозки образца после криогенного хранения.

[0113] Посредством обеспечения возможности для доноров сохранять их клетки на стадии, когда доноров, и таким образом, их клетки, не подвергают интенсивному лечению заболевания, и/или до получения заболевания или состояния, или его диагноза, такие клетки могут иметь определенные преимущества для использования в клеточной терапии, по сравнению с клетками, собранными после одного или после множества циклов лечения. Например, клетки, собранные до одного или нескольких циклов лечения, могут являться более здоровыми, могут иметь более высокие уровни конкретных видов клеточной активности, могут расти более быстро, и/или могут являться более восприимчивыми к генетической манипуляции, чем клетки, подвергнутые нескольким циклам лечения. Другой пример преимущества в соответствии с вариантами осуществления, описанными в настоящем описании, может включать удобство. Например, благодаря сбору, необязательно, переработке и хранению клеток донора до того, как они потребуются для клеточной терапии, клетки могут являться легко доступными, если и когда они позже понадобятся реципиенту. Это может увеличивать производительность афереза в лаборатории, обеспечивая большую гибкость расписания процесса сбора продукта афереза.

[0114] Иллюстративные способы и системы для криогенного хранения и переработки клеток из образца, такого как образец после афереза, могут включать описанные в Публикации международной патентной заявки no. WO2018170188. В некоторых вариантах осуществления, способ и системы включают сбор продукта афереза до того, как пациенту потребуется клеточная терапия, и затем подвергание образца после афереза криоконсервации для позднейшего использования в способе модификации клеток, например, Т-клеток, с рекомбинантным рецептором (например, CAR). В некоторых случаях, такие способы могут включать способы, описанные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, образец после афереза собирают от субъекта и криоконсервируют до предшествующего отбора Т-клеток, активации, стимуляции, модификации, трансдукции, трансфекции, инкубации, культивирования, сбора, составления популяции клеток, и/или введение составленной популяции клеток субъекту. В таких примерах, криоконсервированный образец после афереза размораживают до подвергания образца одной или нескольким стадиям отбора, таким как любые, как описано в настоящем описании.

[0115] В некоторых вариантах осуществления, подвергнутый криоконсервации и/или криозащите образец клеток (например, образец после афереза или лейкафереза), такой как образец клеток, которые не подвергали предшествующему отбору клеток (например, без предшествующего отбора Т-клеток, такого как отбор посредством хроматографии), размораживают перед его использованием для нижестоящих процессов для промышленного получения популяции клеток для клеточной терапии, например, популяции Т-клеток, содержащей CAR+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления,

такой подвергнутый криоконсервации и/или криозащите образец клеток (например, образец после афереза или лейкофереза) используют в связи со способом, представленным в настоящем описании для терапии модифицированными Т-клетками, например, CAR+ Т-клеточной терапии. В конкретных примерах, дополнительных стадий криоконсервации не проводят до или во время стадий сбора/составления.

В. Отбор клеток посредством хроматографии

[0116] В аспектах способов, представленных в настоящем описании, клетки из образца, например, Т-клетки, отбирают посредством хроматографического выделения, такого как колоночная хроматография, включая аффинную хроматографию или гелепроникающую хроматографию. В некоторых вариантах осуществления, в способе используют средство для отбора, которое связывает селективный маркер, локализованный на поверхности клетки-мишени, например, клетки, подлежащей выделению, отбору или обогащению. Такие способы могут быть описаны как (бесследовая) технология аффинной хроматографии клеток (CATCH), и могут включать любые методы или способы, описанные в Патентных заявках РСТ No. WO2013124474 и WO2015164675, полное содержание которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

[0117] В некоторых вариантах осуществления, подвергнутый криоконсервации и/или криозащите продукт афереза или продукт лейкофереза размораживают. В некоторых вариантах осуществления, размороженную композицию клеток подвергают разведению (например, с использованием бессывороточной среды) и/или промывке (например, с использованием бессывороточной среды), что, в некоторых случаях, может удалять или уменьшать количество непредусмотренных или нежелательных компонентов. В некоторых случаях, разведение и/или промывка удаляет или уменьшает присутствие криопротектора, например, DMSO, содержащегося в размороженном образце, который в ином случае может отрицательно влиять на клеточную жизнеспособность, выход, выделение при продленном воздействии комнатной температуры. В некоторых вариантах осуществления, разведение и/или промывка позволяет замену среды размороженного криоконсервированного продукта на бессывороточную среду, такую как среда, описанная в настоящем описании в разделе III или в РСТ/US2018/064627, содержание которой приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0118] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду (например, базовую среду для размножения Т-клеток OpTmizer™ (ThermoFisher), дополненную одной или несколькими добавками. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько добавок является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду, дополненную одним или несколькими дополнительными компонентами для поддержания, размножения, и/или активации клетки (например, Т-клетки), такими как предоставленные посредством дополнительной добавки (например, добавки для размножения Т-клеток OpTmizer™ (ThermoFisher)). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит заменяющую сыворотку добавку, например, заменитель

сыворотки для иммуноцитов, например, ThermoFisher, #A2596101, заменитель сыворотки для иммуноцитов CTS™ или заменитель сыворотки для иммуноцитов, описанный в Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит свободную форму аминокислоты, такую как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит дипептидную форму L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамин), такую как дипептид в Glutamax™ (ThermoFisher). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит один или несколько рекомбинантных цитокинов, такой как рекомбинантный человеческий IL-2, рекомбинантный человеческий IL-7 и/или рекомбинантный человеческий IL-15.

[0119] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, клетки-мишени, имеют или экспрессируют селективный маркер, как описано в настоящем описании, на клеточной поверхности, так что клетки, подлежащие выделению, отбору или обогащению, определяют по присутствию по меньшей мере одной общей специфической молекулы рецептора. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетку-мишень, может также содержать дополнительные клетки, лишенные селективного маркера. Например, в некоторых вариантах осуществления, Т-клетки отбирают, выделяют или обогащают из образца, содержащего множество типов клеток, например, эритроциты или В-клетки.

[0120] В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора содержится в хроматографической колонке, например, связано, напрямую или опосредованно, с хроматографическим матриксом (например, стационарной фазой). В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора присутствует на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе) на время добавления образца на колонку. В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора является способным связываться опосредованно с хроматографическим матриксом (например, стационарной фазой) посредством реагента, например, реагента для отбора, как описано в настоящем описании, например, в разделе II-A. В некоторых вариантах осуществления, реагент для отбора связан, ковалентно или нековалентно, со стационарной фазой колонки. В некоторых вариантах осуществления, реагент для отбора обратимо иммобилизован на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе). В некоторых случаях, реагент для отбора иммобилизован на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе) посредством ковалентных связей. В некоторых аспектах, реагент для отбора обратимо иммобилизован на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе) нековалентно.

[0121] В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора может присутствовать, например, связанным напрямую (например, ковалентно или нековалентно) или опосредованно посредством реагента для отбора, на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе) на время добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). Таким образом,

при добавлении образца, клетки-мишени можно связывать посредством средства для отбора и иммобилизовать на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе) колонки. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, средство для отбора можно добавлять к образцу. Таким образом, средство для отбора связывается с клетками-мишенями (например, Т-клетками) в образце, и образец можно затем добавлять к хроматографическому матриксу (например, стационарной фазе), содержащей реагент для отбора, где средство для отбора, уже связанное с клетками-мишенями, связывает реагент для отбора, таким образом, иммобилизуя клетки-мишени на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе). В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора связывает реагент для отбора, как описано в настоящем описании, например, как описано в разделе II-A и разделе II-B, посредством партнера по связыванию С, как описано в настоящем описании, содержащегося в средстве для отбора.

[0122] В некоторых аспектах, средство для отбора добавляют к образцу. В конкретных вариантах осуществления, средство для отбора имеет участок связывания В, который специфически связывает молекулу рецептора (например, селективный маркер) на поверхности клетки, например, клетки-мишени. Например, см. раздел II-B и ниже. В некоторых аспектах, средство для отбора также включает партнер по связыванию С, который может специфически и обратимо связывать участок связывания Z реагента для отбора.

[0123] В конкретных аспектах, реагент для отбора может также содержать два или более участков связывания Z, которые может связывать партнер по связыванию С, таким образом, обеспечивая мультимеризацию связывающего рецептор реагента. Этот реагент для отбора, используемый по настоящему изобретению, может, таким образом, также представлять собой реагент для мультимеризации. Реагент для отбора может, например, представлять собой стрептавидин, мутеин стрептавидаина, авидин, мутеин авидина или их смесь. В некоторых аспектах, различные хроматографические матриксы соединены с различными реагентами для отбора, и могут быть наложены на колонку, формируя многокомпонентную систему для разделения.

[0124] В некоторых вариантах осуществления, два или более средств для отбора ассоциированы, например, посредством обратимого или необратимого связывания, с реагентом для отбора, например, посредством одного или множества участков связывания Z, присутствующих на реагенте для отбора. В некоторых случаях, это приводит к тому, что средства для отбора расположены близко друг с другом, так что эффект авидности может иметь место, если клетку-мишень, имеющую (по меньшей мере две копии) молекулу клеточной поверхности (например, селективный маркер), приводят в контакт с средством для отбора, способным связывать конкретную молекулу (например, селективный маркер).

[0125] В некоторых вариантах осуществления, два или более различных средства для отбора, которые являются одинаковыми, т.е., имеют одинаковую специфичность связывания селективного маркера, могут обратимо связывать реагент для отбора. В

некоторых вариантах осуществления, можно использовать по меньшей мере два различных средства для отбора, и в некоторых случаях, три/или четыре различных средства для отбора, которые связывают различные селективные маркеры. В некоторых аспектах, каждое из по меньшей мере двух средств для отбора может связывать различную молекулу (например, селективный маркер), такую как первая молекула, вторая молекула и т.д. В некоторых случаях, различные молекулы (например, селективные маркеры), такие как молекулы поверхности клетки, могут присутствовать на одной и той же клетке-мишени. В других случаях, различные молекулы (например, селективные маркеры), такие как молекулы поверхности клетки, могут присутствовать на различных клетках-мишенях, которые присутствуют в одной и той же популяции клеток. В некоторых случаях, третье, четвертое и т.д. средство для отбора может являться ассоциированным с тем же реагентом, где каждое содержит дополнительный различный участок связывания.

[0126] В некоторых вариантах осуществления, два или более различных средств для отбора содержат одинаковый партнер по связыванию C . В некоторых вариантах осуществления, два или более различных средств для отбора содержат различные партнеры по связыванию. В некоторых аспектах, первое средство для отбора может иметь партнера по связыванию $C1$, который может специфически связывать участок связывания $Z1$, присутствующий на реагенте для отбора, и второе средство для отбора может иметь партнера по связыванию $C2$, который может специфически связывать участок связывания $Z1$ или участок связывания $Z2$, присутствующий на реагенте для отбора. Таким образом, в некоторых случаях, множество участков связывания Z содержатся в реагенте для отбора, включая участки связывания $Z1$ и $Z2$, которые являются способными к обратимому связыванию партнеров по связыванию $C1$ и $C2$, соответственно, содержащихся в средстве для отбора. В некоторых вариантах осуществления, $C1$ и $C2$ являются одинаковыми, и/или $Z1$ и $Z2$ являются одинаковыми. В других аспектах, один или несколько из множества участков связывания Z могут являться различными. В других случаях, один или несколько из множества партнеров по связыванию C могут являться различными. В пределах компетенции специалиста в данной области находится выбор любой комбинации различных партнеров по связыванию C , которые являются совместимыми с реагентом для отбора, содержащим участки связывания Z , при условии, что каждый из партнеров по связыванию C является способным взаимодействовать, например, специфически связываться, с одним из участков связывания Z .

[0127] В конкретных вариантах осуществления, образец, например, образец, содержащий клетки, и средство для отбора, добавляют или приводят в контакт с хроматографическим матриксом, содержащим присоединенный или иммобилизованный реагент для отбора. В конкретных аспектах, реагент для отбора имеет множество участков связывания Z , которые специфически связывают партнер по связыванию C средства для отбора. В конкретных аспектах, средство для отбора связывает реагент для отбора посредством взаимодействия между партнером по связыванию C и участком связывания

Z. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, клетку, например, клетку-мишень, иммобилизуют посредством комплекса, сформированного посредством одного или нескольких участков связывания Z реагента для отбора и участка связывания Z средства для отбора на хроматографическом матриксе. В следующих аспектах, клетки, например, клетки-мишени, можно извлекать из образца, например, посредством отмывки, высвобождения или промывки оставшегося образца от хроматографического матрикса. В конкретных аспектах, средство для отбора можно либо включать в образец, который содержит клетки, либо его можно вносить или приводить в контакт с хроматографическим матриксом для связывания с присоединенным реагентом для отбора или мультимеризации, например, перед добавлением образца к хроматографическому матриксу.

[0128] В некоторых вариантах осуществления, обратимую связь, сформированную между партнером по связыванию C и участком связывания Z, можно разрушать посредством конкурентного средства и/или свободного связывающего средства. В некоторых вариантах осуществления, конкурентное средство и/или свободное связывающее средство может представлять собой биотин, производное или аналог биотина, или связывающий стрептавидин пептид, способные конкурировать за связывание с партнером по связыванию C за один или несколько участков связывания Z. В некоторых вариантах осуществления, партнер по связыванию C и конкурентное средство и/или свободное связывающее средство являются различными, и конкурентное средство и/или свободное связывающее средство имеет более высокую аффинность связывания для одного или нескольких участков связывания Z, по сравнению с аффинностью партнера по связыванию. В конкретных аспектах любых способов, представленных в настоящем описании, добавление конкурентного средства и/или свободного связывающего средства к стационарной фазе хроматографической колонки для нарушения связывания средства для отбора с реагентом для отбора не является необходимым для открепления клеток-мишеней (например, T-клеток) от хроматографического матрикса (например, стационарной фазы).

[0129] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, клетки-мишени из образца, можно извлекать из образца, например, посредством отмывки, высвобождения или промывки оставшегося образца от хроматографического матрикса (например, стационарной фазы). В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6) стадий промывки используют для удаления несвязанных клеток и дебриса из хроматографического матрикса (например, стационарной фазы). В некоторых вариантах осуществления, осуществляют по меньшей мере две стадии промывки. В некоторых вариантах осуществления, образцу позволяют проникать в матрикс в течение по меньшей мере или приблизительно 5, 10, 15, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100 или 120 минут до осуществления одной или нескольких стадий промывки. В некоторых вариантах осуществления, стадию промывки проводят через, приблизительно через или по меньшей мере через 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100

минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу).

[0130] В некоторых вариантах осуществления, проводят множество циклов стадий отбора клеток, где положительно или отрицательно отобранную фракцию с одной стадии подвергают другой стадии отбора, например, последующему положительному или отрицательному отбору. В конкретных вариантах осуществления, методы, способы и реагенты для отбора, выделения и обогащения описаны, например, в Патентной заявке РСТ No. WO2015164675, полное содержание которой приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0131] В некоторых вариантах осуществления, одну стадию отбора можно использовать для выделения клеток-мишеней (например, CD3+ T-клетки) из образца. В некоторых вариантах осуществления, одну стадию отбора можно проводить на одной хроматографической колонке. В некоторых примерах, одна стадия отбора может истощать клетки, экспрессирующие множество маркеров одновременно. Подобным образом, множество типов клеток можно одновременно положительно отбирать. В конкретных вариантах осуществления, стадии отбора повторяют и/или осуществляют более одного раза, где положительно или отрицательно отобранную фракцию с одной стадии подвергают такой же стадии отбора, как повторный положительный или отрицательный отбор. В некоторых примерах, одну стадию отбора повторяют и/или осуществляют более одного раза, например, для увеличения чистоты отобранных клеток и/или для дополнительного удаления и/или истощения отрицательно отобранных клеток из отрицательно отобранной фракции. В конкретных вариантах осуществления, одну или несколько стадий отбора осуществляют два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз или более десяти раз. В конкретных вариантах осуществления, одну или несколько стадий отбора осуществляют и/или повторяют между одним и десятью раз, между одним и пятью раз, или между тремя и пятью раз. В некоторых вариантах осуществления, осуществляют две стадии отбора.

[0132] Отбор клеток можно осуществлять с использованием одной или нескольких хроматографических колонок. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько хроматографических колонок включены в закрытую систему. В некоторых вариантах осуществления, закрытая система представляет собой автоматизированную закрытую систему, например, требующую минимального или не требующую управления пользователем (например, человеком). В некоторых вариантах осуществления, отбор клеток проводят последовательно (например, способ последовательного отбора). В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько хроматографических колонок аранжированы последовательно. Например, первая колонка может быть ориентирована таким образом, что выход колонки (например, элюент) можно подавать, например, посредством присоединенных трубок, во вторую хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления, множество хроматографических колонок могут быть аранжированы последовательно. В некоторых вариантах осуществления, отбор

клеток можно осуществлять посредством проведения последовательных стадий положительного и отрицательного отбора, где на последующей стадии подвергают отрицательную и/или положительную фракцию с предшествующей стадии дополнительному отбору, где весь процесс проводят в одной и той же пробирке или комплекте трубок. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному отбору, в котором первый отбор проводят для обогащения по одной из CD4+ или CD8+ популяций, и неотобранные клетки из первого отбора используют в качестве источника клеток для второго отбора для обогащения по отличным от CD4+ или CD8+ популяциям. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям из одной или обеих из CD4+ или CD8+ популяций, например, центральным Т-клеткам памяти (T_{CM}), наивным Т-клеткам и/или клеткам, положительным по или экспрессирующим высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени подвергают последовательному отбору, в котором первый отбор проводят для обогащения по CD3+ популяции, и отобранные клетки используют в качестве источника клеток для второго отбора для обогащения по CD3+ популяции. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени подвергают последовательному отбору, в котором первый отбор проводят для обогащения по CD3+ популяции на первой стационарной фазе (например, в первой хроматографической колонке), и проскок, содержащий несвязанные клетки, используют в качестве источника клеток для второго отбора для обогащения по CD3+ популяции на второй стационарной фазе (например, во второй хроматографической колонке), где первая и вторая стационарные фазы аранжированы последовательно. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям из CD3+ популяции, например, центральным Т-клеткам памяти (T_{CM}), наивным Т-клеткам и/или клеткам, положительным по или экспрессирующим высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному отбору, в котором первый отбор проводят для обогащения по CD3+ популяции, и отобранные клетки используют в качестве источника клеток для второго отбора для обогащения по CD4+ популяциям. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям из CD3+CD4+ популяции, например, центральным Т-клеткам памяти (T_{CM}), наивным Т-клеткам и/или клеткам, положительным по или экспрессирующим высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному отбору, в котором первый отбор проводят для

обогащения по CD3+ популяции, и отобранные клетки используют в качестве источника клеток для второго отбора для обогащения по CD8+ популяции. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям из CD3+CD8+ популяции, например, центральным Т-клеткам памяти (Т_{СМ}), наивным Т-клеткам и/или клеткам, положительным по или экспрессирующим высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. Предусматривают, что, в некоторых аспектах, специфические субпопуляции Т-клеток (например, CD3+ клетки), такие как клетки, положительные по или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клетки, отбирают посредством способов последовательного положительного или отрицательного отбора.

[0133] В некоторых вариантах осуществления, отбор клеток проводят параллельно (например, способ параллельного отбора). В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько хроматографических колонок аранжированы параллельно. Например, две или более колонок могут быть аранжированы таким образом, что образец наносят на две или более колонок одновременно посредством трубок, позволяющих добавление образца в каждую колонку, например, без необходимости прохождения образца через первую колонку. Например, с использованием способа параллельного отбора, отбор клеток можно осуществлять посредством проведения одновременных стадий положительного и/или отрицательного отбора, например, в закрытой системе, где весь процесс проводят в одной и той же пробирке или комплекте трубок. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельному отбору, в котором образец наносят на две или более хроматографических колонки, где каждая колонка осуществляет отбор популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, две или более хроматографических колонки осуществляют отбор CD3+, CD4+ или CD8+ популяций индивидуально. В некоторых вариантах осуществления, две или более хроматографических колонки, включая аффинную хроматографию или гель-проникающую хроматографию, независимо осуществляют отбор одной и той же популяции клеток. Например, две или более хроматографических колонки могут осуществлять отбор CD3+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, две или более хроматографических колонки, включая аффинную хроматографию или гель-проникающую хроматографию, независимо осуществляют отбор различных популяций клеток. Например, две или более хроматографических колонки независимо могут осуществлять отбор CD3+ клеток, CD4+ клетки, и CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы, например, с использованием способов последовательного отбора, можно проводить для обогащения по субпопуляциям из одной или всех популяций клеток, отобранных посредством параллельного отбора. Например, отобранные клетки можно дополнительно отбирать по центральным Т-клеткам памяти

(T_{CM}), наивным Т-клеткам и/или клеткам, положительным по или экспрессирующим высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельному отбору, в которых параллельный отбор проводят для обогащения по CD3+ популяции на двух или более колонок. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям из CD3+ популяции, например, центральным Т-клеткам памяти (T_{CM}), наивным Т-клеткам и/или клеткам, положительным по или экспрессирующим высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельному отбору, в котором отбор проводят для обогащения по CD3+ популяции и CD4+ популяции на двух или более колонок, независимо. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям из CD3+ и CD4+ популяций, например, центральным Т-клеткам памяти (T_{CM}), наивным Т-клеткам и/или клеткам, положительным по или экспрессирующим высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельному отбору, в котором параллельный отбор проводят для обогащения по CD3+ популяции и CD8+ популяции. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям из CD3+ и CD8+ популяций, например, центральным Т-клеткам памяти (T_{CM}), наивным Т-клеткам и/или клеткам, положительным по или экспрессирующим высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельному отбору, в котором параллельный отбор проводят для обогащения по CD4+ популяции и CD8+ популяции. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям из CD4+ и CD8+ популяций, например, центральным Т-клеткам памяти (T_{CM}), наивным Т-клеткам и/или клеткам, положительным по или экспрессирующим высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, и/или CD45RO+. Предусматривают, что, в некоторых аспектах, специфические субпопуляции Т-клеток (например, CD3+, CD4+, CD8+ Т-клетки), такие как клетки, положительные по или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клетки, отбирают посредством способов параллельного положительного или

отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления, способы последовательного и параллельного отбора можно использовать в комбинации.

[0134] В некоторых вариантах осуществления, две колонки используют для параллельного отбора. В некоторых вариантах осуществления, в двух колонках проводят отбор одинакового типа клеток (например, по одинаковому селективному маркеру). В некоторых вариантах осуществления, на каждой из двух колонок проводят отбор CD3+ Т-клеток.

[0135] Как правило, емкость связывания стационарной фазы (например, смолы для отбора) влияет на то, как много стационарной фазы необходимо для отбора конкретного количества групп-мишеней, например, клеток-мишеней, таких как Т-клетки. Емкость связывания, например, количество клеток-мишеней, которые можно иммобилизовать на мл стационарной фазы (например, смолы для отбора), можно использовать для определения или контроля количества связанных клеток-мишеней на одной или нескольких колонках. Одну или несколько хроматографических колонок можно использовать для отбора и стимуляции клеток на колонке, описанных в настоящем описании. При использовании множества колонок, они могут быть аранжированы последовательно, параллельно, или в их подходящей комбинации. Таким образом, емкость связывания стационарной фазы (например, смолы для отбора) можно использовать для стандартизации количества реагента в способе с одной колонкой или количества реагента для каждой колонки в способе с множеством колонок.

[0136] В некоторых вариантах осуществления, емкость связывания стационарной фазы, используемой по настоящему изобретению, представляет собой максимальное количество клеток-мишеней, связанных со стационарной фазой в условиях данного растворителя и концентрации клеток, когда избыток клеток-мишеней наносят на стационарную фазу. В некоторых вариантах осуществления, емкость связывания составляет точно или приблизительно 100 миллионов \pm 25 миллионов клеток-мишеней (например, Т-клеток) на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, емкость статического связывания стационарной фазы (например, смолы для отбора), описанной в настоящем описании, лежит в диапазоне между приблизительно 75 миллионов и приблизительно 125 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы. В одном аспекте, емкость связывания стационарной фазы, используемой по настоящему изобретению, для отбора и стимуляции клеток на колонке, представляет собой емкость статического связывания. В некоторых вариантах осуществления, емкость статического связывания представляет собой максимальное количество клеток, способных к иммобилизации на стационарной фазе, например, в условиях конкретного растворителя и концентрации клеток. В некоторых вариантах осуществления, емкость статического связывания стационарной фазы (например, смолы для отбора), описанной в настоящем описании, лежит в диапазоне между приблизительно 50 миллионов и приблизительно 100 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, емкость статического связывания составляет точно или приблизительно

100 миллионов±25 миллионов клеток-мишеней (например, Т-клеток) на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, емкость статического связывания стационарной фазы (например, смолы для отбора), описанной в настоящем описании, лежит в диапазоне между приблизительно 75 миллионов и приблизительно 125 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, емкость статического связывания стационарной фазы (например, смолы для отбора) составляет между приблизительно 10 миллионов и приблизительно 20 миллионов, между приблизительно 20 миллионов и приблизительно 30 миллионов, между приблизительно 30 миллионов и приблизительно 40 миллионов, между приблизительно 40 миллионов и приблизительно 50 миллионов, между приблизительно 50 миллионов и приблизительно 60 миллионов, между приблизительно 60 миллионов и приблизительно 70 миллионов, между приблизительно 70 миллионов и приблизительно 80 миллионов, между приблизительно 80 миллионов и приблизительно 90 миллионов, между приблизительно 90 миллионов и приблизительно 100 миллионов, между приблизительно 110 миллионов и приблизительно 120 миллионов, между приблизительно 120 миллионов и приблизительно 130 миллионов, между приблизительно 130 миллионов и приблизительно 140 миллионов, между приблизительно 140 миллионов и приблизительно 150 миллионов, между приблизительно 150 миллионов и приблизительно 160 миллионов, между приблизительно 160 миллионов и приблизительно 170 миллионов, между приблизительно 170 миллионов и приблизительно 180 миллионов, между приблизительно 180 миллионов и приблизительно 190 миллионов или между приблизительно 190 миллионов и приблизительно 200 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы.

[0137] В некоторых вариантах осуществления, емкость связывания стационарной фазы, используемой по настоящему изобретению, представляет собой количество клеток-мишеней, связанных со стационарной фазой в условиях данного потока до возникновения значительного проскока несвязанных клеток-мишеней. В одном аспекте, емкость связывания стационарной фазы, используемой по настоящему изобретению, для отбора и стимуляции клеток на колонке, представляет собой емкость динамического связывания, т.е., емкость связывания в рабочих условиях в набитой хроматографической колонке во время нанесения образца. В некоторых вариантах осуществления, емкость динамического связывания определяют посредством нанесения образца, содержащего известную концентрацию клеток-мишеней, и мониторинга проскока, и клетки-мишени связываются со стационарной фазой до конкретной точки проскока, перед тем как несвязанные клетки-мишени будут протекать через колонку. В некоторых вариантах осуществления, емкость динамического связывания составляет точно или приблизительно 100 миллионов±25 миллионов клеток-мишеней (например, Т-клеток) на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, емкость динамического связывания стационарной фазы (например, смолы для отбора), описанной в настоящем описании, составляет между точно или приблизительно 75 миллионов и приблизительно 125 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах

осуществления, емкость динамического связывания стационарной фазы (например, смолы для отбора), описанной в настоящем описании лежит в диапазоне между приблизительно 50 миллионов и приблизительно 100 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, емкость динамического связывания стационарной фазы (например, смолы для отбора) составляет между приблизительно 10 миллионов и приблизительно 20 миллионов, между приблизительно 20 миллионов и приблизительно 30 миллионов, между приблизительно 30 миллионов и приблизительно 40 миллионов, между приблизительно 40 миллионов и приблизительно 50 миллионов, между приблизительно 50 миллионов и приблизительно 60 миллионов, между приблизительно 60 миллионов и приблизительно 70 миллионов, между приблизительно 70 миллионов и приблизительно 80 миллионов, между приблизительно 80 миллионов и приблизительно 90 миллионов, между приблизительно 90 миллионов и приблизительно 100 миллионов, между приблизительно 110 миллионов и приблизительно 120 миллионов, между приблизительно 120 миллионов и приблизительно 130 миллионов, между приблизительно 130 миллионов и приблизительно 140 миллионов, между приблизительно 140 миллионов и приблизительно 150 миллионов, между приблизительно 150 миллионов и приблизительно 160 миллионов, между приблизительно 160 миллионов и приблизительно 170 миллионов, между приблизительно 170 миллионов и приблизительно 180 миллионов, между приблизительно 180 миллионов и приблизительно 190 миллионов, или между приблизительно 190 миллионов и приблизительно 200 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы.

[0138] В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза составляет 20 мл. В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза имеет емкость связывания 2 миллиарда \pm 0,5 миллиардов клеток.

[0139] Любой материал можно использовать в качестве хроматографического матрикса (например, стационарной фазы). Как правило, пригодный хроматографический материал является по существу нетоксичным, т.е., безвредным для жизнеспособности клеток, например, при использовании в набитой хроматографической колонке в желательных условиях. В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза остается в predetermined локализации, например, в predetermined положении, в то время как локализация образца меняется. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза является частью хроматографической системы, через которую протекает подвижная фаза (либо в проточном, либо в периодическом режиме) и где происходит распределение компонентов, содержащихся в жидкой фазе (либо растворенных, либо диспергированных), между фазами.

[0140] В некоторых вариантах осуществления, хроматографический матрикс имеет форму твердой или полутвердой фазы, в то время как образец, содержащий клетку-мишень, подлежащую выделению/отделению, представляет собой жидкую фазу. Хроматографический матрикс может представлять собой материал в форме частиц (любого пригодного размера и формы) или монолитный хроматографический материал,

включая бумажный субстрат или мембрану. Таким образом, в некоторых аспектах, хроматография может представлять собой хроматографию на колонке так же как планарную хроматографию. В некоторых вариантах осуществления, в дополнение к стандартным хроматографическим колонкам, колонки, позволяющие двунаправленный поток, такие как колонки PhyTip[®], доступные из PhyNexus, Inc. San Jose, CA, U.S.A., или наконечники пипеток можно использовать для способов на основе колонки/проточного режима. Таким образом, в некоторых случаях, наконечники пипеток или колонки, позволяющие двунаправленный поток, также включены в хроматографические колонки, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению. В некоторых случаях, например, где используют материал матрикса в форме частиц, материал матрикса в форме частиц может, например, иметь средний размер частиц от приблизительно 5 мкм до приблизительно 200 мкм или от приблизительно 5 мкм до приблизительно 400 мкм, или от приблизительно 5 мкм до приблизительно 600 мкм. В некоторых аспектах, хроматографический матрикс может, например, представлять собой или включать полимерную смолу или оксид металла, или оксид металлоида. В некоторых аспектах, например, где используют планарную хроматографию, материал матрикса может представлять собой любой материал, пригодный для планарной хроматографии, такой как общепринятые мембраны на основе целлюлозы или на основе органического полимера (например, бумажную мембрану, нитроцеллюлозную мембрану или поливинилидендифторидную (PVDF) мембрану), или покрытые силикагелем стеклянные пластины. В одном варианте осуществления, хроматографический матрикс/стационарная фаза представляет собой немагнитный материал или не поддающийся намагничиванию материал.

[0141] В некоторых вариантах осуществления, немагнитные или не поддающиеся намагничиванию хроматографические стационарные фазы, пригодные для способов по настоящему изобретению, включают дериватизированный силикагель или перекрестно сшитый гель. В некоторых аспектах, перекрестно сшитый гель может быть основан на природном полимере, например, на классе полимера, встречающемся в природе. Например, природный полимер, на котором может быть основана хроматографическая стационарная фаза, представляет собой полисахарид. В некоторых случаях, соответствующий полисахарид является в основном перекрестно сшитым. Пример полисахаридного матрикса включает, но без ограничения, агарозный гель (например, агарозу Superflow[™] или материал Sepharose[®], такой как Superflow[™] Sepharose[®], который является коммерчески доступным с различными размерами бусин и пор) или гель из перекрестно сшитого декстрана(декстранов). Дополнительный иллюстративный пример представляет собой перекрестно сшитый агарозный матрикс в форме частиц, с которым декстран является ковалентно связанным, который является коммерчески доступным (с различными размерами бусин и с различными размерами пор) как Sephadex[®] или Superdex[®], оба доступные из GE Healthcare. Дополнительный иллюстративный пример

такого хроматографического материала представляет собой Sephacryl®, который также является доступным с различными размерами бусин и пор от GE Healthcare.

[0142] В некоторых вариантах осуществления, перекрестно сшитый гель может быть также основан на синтетическом полимере, например, на классе полимера, не встречающемся в природе. В некоторых аспектах, такой синтетический полимер, на котором основана хроматографическая стационарная фаза, представляет собой полимер, который имеет полярные мономерные звенья, и который, таким образом, сам является полярным. Таким образом, в некоторых случаях, такой полярный полимер является гидрофильным. Гидрофильные молекулы, также названные липофобными, в некоторых аспектах содержат группы, которые могут формировать диполь-дипольные взаимодействия с молекулами воды. Как правило, гидрофобные молекулы, также названные липофильными, имеют тенденцию отделяться от воды.

[0143] В общем, хроматографический способ представляет собой хроматографию с подвижной фазой, как правило, жидкостную хроматографию. В некоторых аспектах, хроматографию можно проводить в проточном режиме, в котором жидкий образец, содержащий клетки, например, клетки-мишени, наносят, например, под действием силы тяжести/или посредством насоса, на один конец колонки, содержащей хроматографический матрикс, и в которых жидкий образец выходит из колонки на другом конце колонки. Кроме того, хроматографию можно проводить в режиме «вверх и вниз», в котором жидкий образец, содержащий клетки, подлежащие выделению, наносят, например, посредством пипетки на один конец колонки, содержащей хроматографический матрикс, набитый в наконечник пипетки, и в котором жидкий образец входит и выходит из хроматографического матрикса/наконечника пипетки на другом конце колонки. Альтернативно, хроматографию можно также проводить в периодическом режиме, в котором хроматографический материал (стационарную фазу) инкубируют с образцом, который содержит клетки, например, при встряхивании, поворачивании/или повторяющемся контакте и удалении жидкого образца, например, посредством пипетки.

[0144] В некоторых аспектах, любой материал можно использовать в качестве хроматографического матрикса в контексте изобретения, при условии, что материал является пригодным для хроматографического выделения, например, отбора клеток. В конкретных аспектах, пригодный хроматографический материал является по меньшей мере нетоксичным или в основном нетоксичным, например, безвредным для жизнеспособности клеток, при использовании в набитой хроматографической колонке в желательных условиях для выделения клеток и/или разделения клеток. В некоторых аспектах, хроматографический матрикс остается в predetermined локализации, как правило, в predetermined положении, в то время как локализация образца, подлежащего разделению, и включенных в него компонентов, меняется. Таким образом, в некоторых аспектах, хроматографический матрикс представляет собой «стационарную фазу».

[0145] Как правило, соответствующий хроматографический матрикс имеет форму твердой или полутвердой фазы, то время как образец, содержащий клетку-мишень, подлежащую выделению/отделению, представляет собой жидкую фазу. Подвижная фаза, используемая для осуществления хроматографического разделения, подобным образом, представляет собой жидкую фазу. Хроматографический матрикс может представлять собой материал в форме частиц (любого пригодного размера и формы) или монолитный хроматографический материал, включая бумажный субстрат или мембрану. Таким образом, хроматография может представлять собой хроматографию на колонке, так же как планарную хроматографию. В дополнение к стандартным хроматографическим колонкам, колонки, позволяющие двунаправленный поток, или наконечники пипеток можно использовать для хроматографического разделения клеток на основе колонки/проточного режима, как описано в настоящем описании. В некоторых аспектах, используют материал матрикса в форме частиц, и материал матрикса в форме частиц может, например, иметь средний размер частиц от приблизительно 5 мкм до приблизительно 200 мкм или от приблизительно 5 мкм до приблизительно 400 мкм, или от приблизительно 5 мкм до приблизительно 600 мкм. В некоторых аспектах, используют планарную хроматографию, и материал матрикса может представлять собой любой материал, пригодный для планарной хроматографии, такой как общепринятые мембраны на основе целлюлозы или на основе органического полимера (например, бумажную мембрану, нитроцеллюлозную мембрану или поливинилидендифторидную (PVDF) мембрану), или покрытые силикагелем стеклянные пластины.

[0146] В некоторых аспектах, хроматографический матрикс/стационарная фаза представляет собой немагнитный материал или не поддающийся намагничиванию материал. Такой материал может включать дериватизированный силикагель или перекрестно сшитый гель. Перекрестно сшитый гель (который, как правило, изготавливают в форме бусин) может быть основан на природном полимере, таком как перекрестно сшитый полисахарид. Пригодные примеры включают, но без ограничения, агарозные гели или гель из перекрестно сшитого декстрана(декстранов). Перекрестно сшитый гель может быть также основан на синтетическом полимере, т.е. на классе полимера, не встречающемся в природе. Обычно такой синтетический полимер, на котором основана хроматографическая стационарная фаза для разделения клеток, представляет собой полимер, который имеет полярные мономерные звенья, и который, таким образом, сам является полярным.

[0147] Иллюстративные примеры пригодных синтетических полимеров представляют собой полиакриламид(ы), стирол-дивинилбензолный гель и сополимер акрилата и диола или акриламида и диола. Иллюстративный пример представляет собой полиметакрилатный гель, коммерчески доступный как Fractogel®. Дополнительный пример представляет собой сополимер этиленгликоля и метакрилата, коммерчески доступный как Toyopearl®. В некоторых вариантах осуществления, хроматографическая стационарная фаза может также включать компоненты природного и синтетического

полимера, например, композитный матрикс или композит или сополимер полисахарида и агарозы, например, композит полиакриламида/агарозы или полисахарида и N, N'-метиленабисакриламида. Иллюстративный пример сополимера декстрана и N, N'-метиленабисакриламида представляет собой вышеупомянутые серии материала Sephacryl®. Дериватизированный силикагель может включать частицы силикагеля, связанные с синтетическим или природным полимером. Примеры таких вариантов осуществления включают, но без ограничения, силикагель с привитым полисахаридом, силикагель с привитым поливинилпирролидоном, силикагель с привитым полиэтиленоксидом, поли(2-гидроксиэтилспартамид)силикагель и силикагель с привитым поли(N-изопропилакриламидом).

[0148] Хроматографический матрикс, используемый по настоящему изобретению, представляет собой, в некоторых вариантах осуществления, матрикс для гель-фильтрации (также известной как эксклюзионная хроматография). Гель-фильтрацию можно характеризовать по тому свойству, что она разработана, чтобы не подвергаться, по меньшей мере по существу, взаимодействию с клетками, подлежащими разделению. Таким образом, матрикс для гель-фильтрации позволяет разделить клетки или других биологических объектов, как определено в настоящем описании, по большей части на основании их размера. Соответствующий хроматографический матрикс представляет собой, как правило, пористый материал в форме частиц, как упомянуто выше. Хроматографический матрикс может иметь конкретный эксклюзионный предел, который, как правило, определяют в отношении молекулярной массы, выше которой полностью исключен вход молекул в поры. Соответствующую молекулярную массу, определяющую эксклюзионный предел, можно выбирать, чтобы она была ниже массы, соответствующей массе клетки-мишени (или биологического объекта), подлежащих выделению. В таком варианте осуществления, предотвращают вход клетки-мишени в поры матрикса для эксклюзионной хроматографии. Подобным образом, стационарная фаза, представляющая собой матрикс для аффинной хроматографии, может иметь поры, имеющие размер, меньший, чем размер выбранной клетки-мишени. В иллюстративных вариантах осуществления, матрикс для аффинной хроматографии и/или матрикс для гель-фильтрации имеет средний размер пор от 0 до приблизительно 500 нм.

[0149] Другие компоненты, присутствующие в образце, такие как стимулирующие средства и/или стимулирующие реагенты (например, олигомерные стимулирующие реагенты), могут иметь размер, который ниже эксклюзионного предела пор, и который может входить в поры матрикса для эксклюзионной хроматографии. Из таких компонентов, которые являются способными частично или полностью входить в объем пор, более крупные молекулы, с меньшим доступом к объему пор, обычно элюируют первыми, в то время как наименьшие молекулы элюируют последними. В некоторых вариантах осуществления, эксклюзионный предел матрикса для эксклюзионной хроматографии выбирают, чтобы он был ниже максимальной ширины клетки-мишени. Таким образом, компоненты, имеющие доступ к объему пор, обычно остаются дольше

в/на матриксе для эксклюзионной хроматографии, чем клетка-мишень. Таким образом, клетки-мишени можно собирать в элюате хроматографической колонки, отдельно от других объектов/компонентов образца. Таким образом компоненты, такие как стимулирующий реагент, элюируют в более поздней временной точке из матрикса для гель-фильтрации, чем для клетки-мишени. Этот эффект разделения можно дополнительно увеличивать, если гель-проникающий матрикс содержит реагент для отбора (обычно ковалентно связанный с ним), который содержит участки связывания, например, участки связывания Z, которые являются способными связывать реагенты, такие как реагент для отбора и/или конкурентный реагент, присутствующий в образце. Средство для отбора и/или конкурентный реагент могут быть связаны участками связывания Z аффинного реагента и таким образом, иммобилизованы на гель-проникающем матриксе. Этот способ обычно осуществляют в съемном картридже, и в некоторых вариантах осуществления, в способе, комбинации и наборе по изобретению включают и/или используют такой матрикс для гель-фильтрации. В соответствующем способе клетки, соответственно, разделяют на основании размера.

[0150] Хроматографический матрикс, используемый по настоящему изобретению, может также включать способный к магнитному притяжению материал, такой как одна или несколько способных к магнитному притяжению частиц или ферромагнитная жидкость. Соответствующая способная к магнитному притяжению частица может содержать реагент для отбора с участком связывания (например, средство для отбора), способный связывать и иммобилизовывать клетку-мишень на хроматографическом матриксе. Способные к магнитному притяжению частицы могут содержать диамагнитный, ферромагнитный, парамагнитный или суперпарамагнитный материал. Суперпарамагнитный материал отвечает на воздействие магнитного поля посредством индукции магнитного поля без получения постоянного намагничивания. Магнитные частицы на основе оксида железа являются, например, коммерчески доступным как Dynabeads® из Dynal Biotech, как магнитные MicroBeads от Miltenyi Biotec, как магнитные пористые стеклянные бусины из CPG Inc., так же как из различных других источников, таких как Roche Applied Science, BIOCLON, BioSource International Inc., micromod, AMBION, Merck, Bangs Laboratories, Polysciences, или Novagen Inc., если назвать только некоторые примеры. Магнитные наночастицы на основе суперпарамагнитных нанокристаллов Co и FeCo, так же как ферромагнитных нанокристаллов Co, описаны, например, в Hütten, A. et al. (J. Biotech. (2004), 112, 47-63). Однако, в некоторых вариантах осуществления, хроматографический матрикс, используемый по настоящему изобретению, не содержит никакого способного к магнитному притяжению материала.

Средство для отбора

[0151] Как описано выше, в конкретных аспектах, в способах, представленные в настоящем описании, используют средство для отбора. В некоторых вариантах осуществления, средство, как описано в разделе II-B, представляет собой средство для отбора. В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора связывает молекулу

на поверхности клетки, такую как молекула клеточной поверхности. В некоторых случаях, молекула клеточной поверхности представляет собой селективный маркер. В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора является способным специфически связывать селективный маркер, экспрессированный одной или несколькими клетками в образце. В некоторых вариантах осуществления, ссылка на специфическое связывание молекулы, такой как молекула клеточной поверхности/или рецептор клеточной поверхности, на протяжении настоящего описания, не обязательно означает, что средство связывает только такую молекулу. Например, средство, которое специфически связывает молекулу, может связывать другие молекулы, как правило, с намного более низкой аффинностью, как определено, например, посредством иммуноанализов, BIAcore®, устройства KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или других анализов. В некоторых случаях, способность средства, в условиях специфического связывания, связывать молекулу-мишень, является такой, что его аффинность или авидность является по меньшей мере в 5 раз больше, например, по меньшей мере в 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250 или 500 раз больше, или даже по меньшей мере в 1000 раз больше, чем средняя аффинность или авидность того же самого средства для коллекции случайных пептидов или полипептидов статистически достаточного размера.

[0152] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, клетки-мишени (например, Т-клетки), имеют или экспрессируют молекулу на клеточной поверхности, например, селективный маркер, так что клетки, подлежащие отбору, определяют по присутствию по меньшей мере одной общей специфической молекулы (например, селективного маркера). В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетку-мишень, может также содержать дополнительные клетки, лишённые этой молекулы (например, селективного маркера). Например, в некоторых вариантах осуществления, Т-клетки можно отбирать из образца, содержащего множество типов клеток, например, эритроциты или В-клетки. Селективный маркер и молекула рецептора могут быть использованы взаимозаменяемо в настоящем описании для обозначения молекулы клеточной поверхности.

[0153] В некоторых вариантах осуществления, селективный маркер (например, молекула рецептора), локализованный на клеточной поверхности, например, поверхности клетки-мишени, может представлять собой любую молекулу, при условии, что она остается ковалентно или нековалентно связанной с поверхностью клетки во время процесса хроматографического разделения в способе по изобретению. Селективный маркер (например, молекула рецептора) представляет собой молекулу, против которой может быть нацелено средство для отбора. В некоторых вариантах осуществления, селективный маркер представляет собой пептид или белок, такой как мембранный рецепторный белок. В некоторых вариантах осуществления, селективный маркер представляет собой липид, полисахарид или нуклеиновую кислоту. Селективный маркер (например, молекула рецептора), являющийся белком, может представлять собой периферический мембранный белок или встроенный в мембрану белок. Он может, в

некоторых вариантах осуществления, иметь один или несколько доменов, пересекающих мембрану. В конкретных вариантах осуществления, селективный маркер представляет собой поверхностный белок иммуноцита, например, CD3, CD4 или CD8. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер может представлять собой антиген, определяющий желательную популяцию или субпопуляцию клеток, например, популяцию или субпопуляцию клеток крови, например, лимфоциты (например, Т-клетки, CD4+ Т-клетки или CD8+ Т-клетки).

[0154] В некоторых аспектах, молекула клеточной поверхности, например, селективный маркер, может представлять собой антиген, определяющий желательную популяцию или субпопуляцию клеток, например, популяцию или субпопуляцию клеток крови, например, лимфоциты (например, Т-клетки, Т-клетки-помощники, например, CD3+ Т-клетки, CD8 Т-клетки, CD4+ Т-клетки-помощники, В-клетки или клетки естественные киллеры), моноциты, или стволовые клетки, например, CD34-положительные периферические стволовые клетки или экспрессирующие Nanog или Oct-4 стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления, селективный маркер может представлять собой маркер, экспрессированный на поверхности Т-клеток или подгруппы Т-клеток, такой как CD25, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO. Примеры Т-клеток включают такие клетки, как специфические для CMV CD8+ Т-лимфоциты, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти и регуляторные Т-клетки (Трег). Иллюстративный пример Трег включает CD4 CD25 CD45RA Трег-клетки, и иллюстративный пример Т-клеток памяти включает специфические для CD62L CD8+ центральные Т-клетки памяти.

[0155] Как упомянуто выше, в некоторых вариантах осуществления, средство для отбора имеет или содержит участок связывания В. В конкретных вариантах осуществления, участок связывания В является одновалентным. В некоторых аспектах, одновалентный участок связывания В представляет собой или содержит одновалентный фрагмент антитела или белковую связывающую молекулу с иммуноглобулиноподобными функциями, аптамер или молекула МНС. Примеры одновалентных фрагментов антител включают, но без ограничения, фрагмент Fab, фрагмент Fv, и одноцепочечный фрагмент Fv (scFv), включая двухвалентный одноцепочечный фрагмент Fv. Примеры (рекомбинантных) фрагментов антител представляют собой фрагменты Fab, фрагменты Fv, одноцепочечные фрагменты Fv (scFv), двухвалентный фрагмент антитела, такой как (Fab)₂'-фрагмент, диатела, триатела (Iliades, P., et al., FEBS Lett (1997) 409, 437-441), декатела (Stone, E., et al., Journal of Immunological Methods (2007) 318, 88-94) и другие доменные антитела (Holt, L.J., et al., Trends Biotechnol. (2003), 21, 11, 484-490). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько участков связывания средства для отбора может представлять собой двухвалентную белковую искусственную связывающую молекулу, такую как димерный мутеин липокалина, также известный как «дуокалин». В некоторых вариантах осуществления связывающий рецептор реагент может иметь один второй участок связывания, т.е., он может являться одновалентным.

Примеры одновалентных связывающих рецептор реагентов включают, но без ограничения, одновалентный фрагмент антитела, белковую связывающую молекулу с антителоподобными свойствами связывания или молекулу МНС.

[0156] Еще несколькими дополнительными примерами подходящих белковых связывающих молекул являются EGF-подобный домен, Ktringle-домен, домен фибронектина типа I, домен фибронектина типа II, домен фибронектина типа III, домен PAN, домен G1a, домен SRCR, домен Кунитца/ингибитора трипсина поджелудочной железы быка, тендамистат, домен ингибитора сериновых протеаз типа Kazal, трилистниковый домен (P-типа), домен типа C фактора фон Виллебранда, подобный анафилатоксину домен, домен CUB, тиреоглобулиновый повтор типа I, домен класса A рецептора LDL, домен Sushi, домен Link, домен тромбоспондина типа I, домен иммуноглобулина или иммуноглобулиноподобный домен (например, доменные антитела или антитела верблюдовых, содержащие только тяжелые цепи), домен лектина C-типа, домен MAM, домен типа A фактора фон Виллебранда, домен соматомедина B, коровий домен WAP-типа с четырьмя дисульфидными связями, домен F5/8 типа C, домен гемопексина, домен SH2, домен SH3 домен, EGF-подобный домен ламининового типа, домен C2, «каппа-антитела» (ср. Ill. et al., *Protein Eng* (1997) 10, 949-57, так называемое «миниантитело» (Martin et al., *EMBO J* (1994) 13, 5303-5309), а диатело (ср. Holliger et al., *PNAS USA* (1993)90, 6444-6448), так называемые «янусины» (ср. Traunecker et al., *EMBO J* (1991) 10, 3655-3659, или Traunecker et al., *Int J Cancer* (1992) Suppl 7, 51-52), нанотело, микротело, аффилин, аффитело, ноггин, убиквитин, белок с цинковыми пальцами, аутофлуоресцентный белок или белок с богатыми лейцином повторами. Примером молекулы нуклеиновой кислоты с антителоподобными функциями является аптамер. Аптамер сворачивается в определенный трехмерный мотив и имеет высокую аффинность для данной структуры мишени.

[0157] В конкретных аспектах, средство для отбора содержит партнер по связыванию C. В некоторых аспектах, партнер по связыванию C, включенный в средство для отбора, может, например, быть основан на углеводороде (включая полимерный) и включает группы азота, фосфора, серы, карбена, галогена или псевдогалогена. Он может представлять собой спирт, органическую кислоту, неорганическую кислоту, амин, фосфин, тиол, дисульфид, алкан, аминокислоту, пептид, олигопептид, полипептид, белок, нуклеиновую кислоту, липид, сахарид, олигосахарид или полисахарид. В качестве дополнительных примеров, он может также представлять собой катион, анион, поликатион, полианион, поликатион, электролит, полиэлектролит, углеродную нанотрубку или углеродную нанопену. Как правило, такой партнер по связыванию имеет более высокую аффинность для участка связывания реагента для отбора или мультимеризации, чем для другого материала. Примеры соответствующего партнера по связыванию включают, но без ограничения, краун-эфир, иммуноглобулин, его фрагмент и белковую связывающую молекулу с антителоподобными функциями.

[0158] В некоторых вариантах осуществления, партнер по связыванию С, включенный в средство для отбора, включает биотин, и реагент для отбора включает аналог стрептавидина или аналог авидина, который обратимо связывает биотин. В некоторых вариантах осуществления, партнер по связыванию С, включенный в средство для отбора, включает аналог биотина, который обратимо связывает стрептавидин или авидин, и реагент для отбора включает стрептавидин, авидин, аналог стрептавидина или аналог авидина, который обратимо связывает соответствующий аналог биотина. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию С, включенный в средство для отбора, включает связывающий стрептавидин или авидин пептид, и реагент для отбора включает стрептавидин, авидин, аналог стрептавидина или аналог авидина, который обратимо связывает соответствующий связывающий стрептавидин или авидин пептид.

[0159] В некоторых вариантах осуществления, партнер по связыванию, включенный в средство для отбора, может включать связывающий стрептавидин пептид. В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность содержит последовательность с общей формулой His-Pro-Xaa, где Xaa представляет собой глутамин, аспарагин или метионин, например, содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность имеет общую формулу, указанную в SEQ ID NO: 11, такую, как указано в SEQ ID NO: 12. В одном примере, пептидная последовательность представляет собой Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (также называемую Strep-меткой®, указанной в SEQ ID NO: 7). В одном примере, пептидная последовательность представляет собой Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (также называемую Strep-меткой® II, указанной в SEQ ID NO: 8), которая описана, например, в Патенте США 6103493 и является коммерчески доступной под торговым наименованием Strep-Tactin®. Связывающие стрептавидин пептиды могут, например, представлять собой одиночные пептиды, такие как «Strep-метка®», описанная, например, в Патенте США 5506121, или связывающие стрептавидин пептиды, имеющие последовательную аранжировку двух или более индивидуальных связывающих модулей, как описано в Международной патентной публикации WO 02/077018 или Патенте США 7981632.

[0160] В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию С средства для отбора включает группу, известную специалисту в данной области как аффинная метка. В таком варианте осуществления реагент для отбора включает соответствующий партнер по связыванию, например, антитело или фрагмент антитела, как известно, связывающий аффинную метку. В качестве нескольких иллюстративных примеров известных аффинных меток, партнер по связыванию, включенный в средство для отбора, может включать динитрофенол или дигоксигенин, олигогистидин, полигистидин, домен иммуноглобулина, связывающий мальтозу белок, глутатион-S-трансферазу (GST), связывающий хитин белок (CBP) или тиоредоксин, связывающий кальмодулин пептид (CBP), FLAG'-пептид, HA-метку, VSV-G-метку, HSV-метку, эпитоп T7, связывающий

мальтозу белок (MBP), эпитоп HSV с последовательностью гликопротеина D вируса простого герпеса, эпитоп «тус» с последовательностью фактора транскрипции с-тус, V5-метку или глутатион-S-трансферазу (GST). В таком варианте осуществления комплекс, сформированный между одним или несколькими участками связывания реагента для отбора, в этом случае, антитела или фрагмента антитела, и антигеном, можно разрушать конкурентным способом посредством добавления свободного антигена, т.е. свободного пептида (эпитопной метки) или свободного белка (такого как MBP или CBP). Аффинная метка также может представлять собой олигонуклеотидную метку. Такую олигонуклеотидную метку можно, например, использовать для гибридизации с олигонуклеотидом с комплементарной последовательностью, связанным с реагентом для отбора или включенным в него.

[0161] В соответствии с одновременно находящейся на рассмотрении Международной патентной заявкой PCT/EP2012/063969, опубликованной как WO 2013/011011, (полное содержание которой приведено в настоящем описании в качестве ссылки для всех целей) сила связывания между средством для отбора и селективным маркером на клетке-мишени может не является важной для обратимости связывания клетки-мишени с реагентом для отбора посредством средства для отбора. Вместо этого, независимо от силы связывания, означающей, соответствует ли константа диссоциации (K_D) для связывания между средством для отбора посредством участка связывания В и селективным маркером низкой аффинности, например, в диапазоне K_D от приблизительно 10^{-3} до приблизительно 10^{-7} М, или высокой аффинности, например, в диапазоне K_D от приблизительно 10^{-7} до приблизительно 1×10^{-10} М, клетку-мишень можно обратимо окрашивать, при условии, что диссоциация связывания средства для отбора посредством участка связывания В и молекулы рецептора происходит достаточно быстро. В этом отношении, константа скорости диссоциации (k_{off}) для связывания между средством для отбора посредством участка связывания В и селективным маркером может иметь значение приблизительно $3 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или более (эта константа скорости диссоциации представляет собой константу, характеризующую реакцию диссоциации комплекса, сформированного между участком связывания В средства для отбора и селективным маркером на поверхности клетки-мишени). Константа скорости связывания (k_{on}) для реакции связывания между участком связывания В средства для отбора и селективным маркером на поверхности клетки-мишени может иметь любое значение. Для обеспечения достаточно обратимого связывания между селективным маркером и средством для отбора, обеспечивает преимущество выбор значения k_{off} для равновесного связывания, чтобы получать значение приблизительно $3 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или более, приблизительно $5 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или более, например, точно или приблизительно $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или более, $5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или более, $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или более, $5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или более, $1 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ или более, $1 \times 10^{-1} \text{ с}^{-1}$ или более, или $5 \times 10^{-1} \text{ с}^{-1}$ или более. В этом случае, следует отметить, что значения кинетических и термодинамических констант, в рамках изобретения, относятся к условиям атмосферного давления, т.е. 1,013 бар (0,1 МПа), и комнатой температуры, т.е. 25°C.

[0162] В некоторых вариантах осуществления средство для отбора имеет одиночный (одновалентный) участок связывания В, способный специфически связывать селективный маркер. В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора имеет по меньшей мере два (т.е., множество участков связывания В, включая три, четыре или также пять идентичных участков связывания В), способных связывать селективный маркер. В любом из этих вариантов осуществления, связывание селективного маркера посредством (каждого из) участка(участков) связывания В может иметь значение k_{off} приблизительно $3 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или более. Таким образом, средство для отбора может представлять собой одновалентную (например, одновалентный фрагмент антитела или одновалентную искусственную связывающую молекулу (белковую или другую), такую как мутеин на основе полипептида из семейства липокалинов (также известный как «антикалин®»), или двухвалентную молекулу, такую как антитело или фрагмент, в которых сохранены оба участка связывания, например, фрагмент $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер может представлять собой мультивалентную молекулу, такую как пентамерная молекула IgE, при условии, что значение k_{off} составляет $3 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или более.

[0163] В некоторых вариантах осуществления изобретения, на молекулярном уровне, не значение k_{off} ($3 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ или более) для связывания средства для отбора посредством по меньшей мере участка связывания В и селективного маркера на клетке-мишени обеспечивает (бесследовое) выделение биологического материала посредством технологии обратимой аффинной хроматографии клеток, описанной в настоящем описании. Вместо этого, и как описано, например, в Патенте США 7776562 или Международной патентной заявке WO02/054065, низкая аффинность связывания между селективным маркером и участком связывания В средства для отбора, вместе с эффектом avidности, опосредованным посредством иммобилизованного реагента для отбора, позволяет обратимое и бесследовое выделение клетки-мишени. В этих вариантах осуществления, комплекс между двумя или более участками связывания Z реагента для отбора и партнером по связыванию С из по меньшей мере двух средств для отбора может формироваться, позволяя обратимую иммобилизацию клеток-мишеней на матриксе для аффинной хроматографии. Как упомянуто выше, такая низкая аффинность связывания может характеризоваться константой диссоциации (K_D) в диапазоне от приблизительно $1,0 \times 10^{-3} \text{ М}$ до приблизительно $1,0 \times 10^{-7} \text{ М}$ для связывания средства для отбора посредством участка связывания В и селективного маркера на поверхности клетки-мишени.

[0164] В некоторых вариантах осуществления, селективный маркер может представлять собой CD4, и средство для отбора специфически связывает CD4. В некоторых аспектах, средство для отбора, которое специфически связывает CD4, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против CD4, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против CD4, одновалентного фрагмента антитела из антитела против CD4 и белковой связывающей CD4 молекулы с антителоподобными свойствами

связывания. В некоторых вариантах осуществления, антитело против CD4, такое как двухвалентный фрагмент антитела или одновалентный фрагмент антитела (например, фрагмент Fab против CD4), может происходить из антитела 13B8.2 или функционально активного мутанта 13B8.2, сохраняющего специфическое связывание CD4. Например, иллюстративные мутанты антитела 13B8.2 или m13B8.2 описаны в Патентах США No. 7482000, Патентной заявке США No. US2014/0295458 или Международной патентной заявке No. WO2013/124474; и Ves, C, et al. *J Biol Chem* 278, 14265-14273 (2003). Мутантный фрагмент Fab, названный «m13B8.2», несет переменный домен связывающего CD4 мышинового антитела 13B8.2 и константный домен, содержащий константный домен CH1 человека типа гамма для тяжелой цепи и константный домен легкой цепи типа каппа человека, как описано в Патенте США 7482000. В некоторых вариантах осуществления, антитело против CD4, например, мутант антитела 13B8.2, содержит аминокислотную замену H91A в переменной легкой цепи, аминокислотную замену Y92A в переменной легкой цепи, аминокислотную замену H35A в переменной тяжелой цепи и/или аминокислотную замену R53A в переменной тяжелой цепи, каждая по нумерации Kabat. В некоторых аспектах, по сравнению с переменными доменами фрагмента Fab 13B8.2 в m13B8.2, остаток His в положении 91 легкой цепи (положении 93 в SEQ ID NO: 30) мутирован до Ala, и остаток Arg в положении 53 тяжелой цепи (положении 55 в SEQ ID NO: 29) мутирован до Ala. В некоторых вариантах осуществления, реагент, обратимо связанный с антителом против CD4 или его фрагментом, является коммерчески доступным или происходит из реагента, который является коммерчески доступным (например, каталожный No. 6-8000-206 или 6-8000-205 или 6-8002-100; IBA GmbH, Göttingen, Germany). В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора содержит фрагмент Fab против CD4. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент Fab против CD4 содержит переменную тяжелую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:29, и переменную легкую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:30. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент Fab против CD4 содержит CDR переменной тяжелой цепи, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:29, и CDR переменной легкой цепи, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:30.

[0165] В некоторых вариантах осуществления, селективный маркер может представлять собой CD8, и средство для отбора специфически связывает CD8. В некоторых аспектах, средство для отбора, которое специфически связывает CD8, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против CD8, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против CD8, одновалентного фрагмента антитела из антитела против CD8 и белковой связывающей CD8 молекулы с антителоподобными свойствами связывания. В некоторых вариантах осуществления, антитело против CD8, например, двухвалентный фрагмент антитела или одновалентный фрагмент антитела (например, фрагмент Fab против CD8) может происходить из антитела OKT8 (например, ATCC CRL-8014) или его функционально активного мутанта, сохраняющего специфическое

связывание с CD8. В некоторых вариантах осуществления, реагент, обратимо связанный с антителом против CD8 или его фрагментом, является коммерчески доступным или происходит из реагента, который является коммерчески доступным (например, каталожный No. 6-8003 или 6-8000-201; IBA GmbH, Gottingen, Germany). В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора содержит фрагмент Fab против CD8. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент Fab против CD8 содержит переменную тяжелую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, и переменную легкую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:37. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент Fab против CD8 содержит CDR переменной тяжелой цепи, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, и CDR переменной легкой цепи, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:37.

[0166] В некоторых вариантах осуществления, селективный маркер может представлять собой CD3, и средство для отбора специфически связывает CD3. В некоторых аспектах, средство для отбора, которое специфически связывает CD3, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против CD3, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против CD3, одновалентного фрагмента антитела из антитела против CD3 и белковой связывающей CD3 молекулы с антителоподобными свойствами связывания. В некоторых вариантах осуществления, антитело против CD3, такое как двухвалентный фрагмент антитела или одновалентный фрагмент антитела (например, фрагмент Fab против CD3) может происходить из антитела OKT3 (например, ATCC CRL-8001; см., например, Stemberger et al. PLoS One. 2012; 7(4): e35798) или его функционально активного мутанта, сохраняющего специфическое связывание с CD3. В некоторых вариантах осуществления, реагент, обратимо связанный с антителом против CD3 или его фрагментом, является коммерчески доступным или происходит из реагента, который является коммерчески доступным (например, каталожный No. 6-8000-201, 6-8001-100; IBA GmbH, Gottingen, Germany). В некоторых вариантах осуществления, средство для отбора содержит фрагмент Fab против CD3. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент Fab против CD3 содержит переменную тяжелую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:31, и переменную легкую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:32. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент Fab против CD3 содержит CDR переменной тяжелой цепи, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:31, и CDR переменной легкой цепи, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:32.

[0167] В любом из вышеуказанных примеров, двухвалентный фрагмент антитела может представлять собой (Fab)₂'-фрагмент, или двухвалентный одноцепочечный фрагмент Fv, в то время как одновалентный фрагмент антитела может быть выбран из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента Fv и одноцепочечного фрагмента Fv (scFv). В любом из вышеуказанных примеров, белковая связывающая молекула с антителоподобными свойствами связывания может представлять собой аптамер, мутин

на основе полипептида из семейства липокалинов, глутело, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллинового каркаса, аднектин и авимер.

С. Стимуляция на колонке

[0168] Способы, представленные в настоящем описании, включают объединение стадии отбора клеток посредством колоночной хроматографии со стимуляцией. Таким образом, в конкретных аспектах, стимуляцию проводят в ходе по меньшей мере части стадии отбора, когда клетки иммобилизованы на колонке (например, посредством средства для отбора). В некоторых вариантах осуществления, где две или более колонок используют для отбора, стимуляцию проводят на каждой колонке. В некоторых вариантах осуществления, где две или более колонок используют для отбора, стимуляцию проводят на меньшем, чем общее, количестве колонок. В некоторых вариантах осуществления, где две или более колонок используют для отбора, стимуляцию проводят по меньшей мере на одной колонке. В некоторых вариантах осуществления, где используют параллельный отбор, стимуляцию проводят на каждой колонке. В некоторых вариантах осуществления, где используют параллельный отбор, стимуляцию проводят по меньшей мере на одной колонке. В некоторых вариантах осуществления, где используют последовательный отбор, стимуляцию проводят на каждой колонке. В некоторых вариантах осуществления, где используют последовательный отбор, стимуляцию проводят по меньшей мере на одной колонке. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают условия, которые стимулируют или активируют, и/или являются способными доставлять стимулирующий сигнал клетке, например, CD3+, CD4+, или CD8+ Т-клетке, такой как сигнал, исходящий от TCR и/или костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия представляют собой или включают инкубацию клетки-мишени (например, Т-клетки), иммобилизованной на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе), со стимулирующим средством, например, средством, которое доставляет стимулирующий сигнал, или является способным доставлять стимулирующий сигнал, таким образом стимулируя отобранную клетку, или со стимулирующим реагентом, включающим стимулирующие средства, такие как олигомерный стимулирующий реагент. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство связывает и стимулирует и/или активирует TCR и/или костимулирующую молекулу. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент представляет собой олигомерный стимулирующий реагент, представленный в настоящем описании, например, как описано в разделе I-C-1a. В конкретных вариантах осуществления, посредством стимуляции популяции клеток в стимулирующих условиях образуют или получают популяцию отобранных и стимулированных клеток (также обозначенную в настоящем описании как стимулированная популяция клеток). На популяцию отобранных и стимулированных клеток можно сослаться в настоящем описании в качестве выходной популяции стимулированных и отобранных клеток. В некоторых случаях, популяция отобранных и

стимулированных клеток может служить в качестве входной популяции для нижестоящей переработки, например, генетической инженерии, как описано в разделе I-E.

[0169] В конкретных вариантах осуществления, клетки из образца отбирают и стимулируют до введения гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида в клетки, например, посредством метода, стадии или способа, описанных в настоящем описании, например, в разделе I-E. В некоторых вариантах осуществления, выходную популяцию отобранных и стимулированных клеток модифицируют для экспрессии гетерологичных или рекомбинантных белков (например, химерных рецепторов антигенов).

[0170] В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию считают начатой, когда клетки из популяции впервые стимулируют или подвергают воздействию условий, которые активируют или стимулируют, и/или являются способными активировать или стимулировать сигнал в клетке, такой как сигнал, исходящий от TCR и/или корцептора, или костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию начинают, когда клетки впервые подвергают контакту или воздействию стимулирующего средства или стимулирующего реагента, такого как стимулирующий реагент, например, как описано в разделе II-A и/или разделе I-C-1b, содержащего стимулирующие средства, описанные в настоящем описании, например, в разделе I-C-1a и/или разделе II-A. В конкретных аспектах, начало стимуляции (также обозначенное в настоящем описании как начало инкубации) происходит, когда клетки-мишени (например, T-клетки) из образца, иммобилизованные на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе), впервые подвергают контакту или воздействию стимулирующего средства или стимулирующего реагента, содержащего стимулирующие средства (например, олигомерного стимулирующего реагента, например, как описано в разделе I-C-1b ниже). В некоторых вариантах осуществления, клеткам позволяют проникать в колонку в течение приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100 или 120 минут до добавления стимулирующего реагента (например, олигомерного стимулирующего реагента) или стимулирующих средств. В некоторых вариантах осуществления, колонку промывают по меньшей мере один (1, 2, 3, 4, 5) раз до добавления стимулирующего реагента (например, олигомерного стимулирующего реагента) или стимулирующих средств. В некоторых вариантах осуществления, колонку промывают по меньшей мере два раза до добавления стимулирующих средств или стимулирующего реагента, включающего стимулирующие средства (например, олигомерного стимулирующего реагента).

[0171] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие средства или стимулирующий реагент, включающий стимулирующие средства (например, олигомерный стимулирующий реагент), добавляют через, приблизительно через или по меньшей мере через 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100 или 120 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие средства или

менее чем, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 часов. В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию, например, инкубацию отобранных клеток в стимулирующих условиях, проводят в течение между точно или приблизительно 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 7-24, 8-24, 9-24, 10-24, 11-24, 12-24, 13-24, 14-24, 15-24, 16-24, 17-24, 18-24, 19-24, 20-24, 21-24, 22-24, 23-24, 2-23, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 или 2-3 часов. В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию, например, инкубацию иммобилизованных клеток в стимулирующих условиях, проводят в течение, в течение приблизительно, или в течение менее чем 24 часов. В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию, например, инкубацию иммобилизованных клеток в стимулирующих условиях, проводят в течение, в течение приблизительно, или в течение менее чем 12 часов. В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию, например, инкубацию иммобилизованных клеток в стимулирующих условиях, проводят в течение, в течение приблизительно, или в течение менее чем 5 часов. В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию, например, инкубацию иммобилизованных клеток в стимулирующих условиях, проводят в течение, в течение приблизительно, или в течение менее чем 4,5 часов. В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию, например, инкубацию иммобилизованных клеток в стимулирующих условиях, проводят в течение, в течение приблизительно, или в течение менее чем 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию, например, инкубацию иммобилизованных клеток в стимулирующих условиях, проводят в течение, в течение приблизительно, или в течение менее чем 2 часов.

[0173] В конкретных вариантах осуществления, количество точно, приблизительно или по меньшей мере 50×10^6 , 100×10^6 , 150×10^6 , 200×10^6 , 250×10^6 , 300×10^6 , 350×10^6 , 400×10^6 , 450×10^6 , 500×10^6 , 550×10^6 , 600×10^6 , 700×10^6 , 800×10^6 , 900×10^6 , $1,000 \times 10^6$, 1250×10^6 , 1500×10^6 , 1750×10^6 , 2000×10^6 , 2250×10^6 , 2500×10^6 , 2750×10^6 , 3000×10^6 , 3250×10^6 , 3500×10^6 , 3750×10^6 , 4000×10^6 , 4250×10^6 , 4500×10^6 , 4750×10^6 или 5000×10^6 клеток, отобранных из образца, или любое количество между любыми из вышеуказанных, стимулируют, например, инкубируют в стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления, отобранные клетки иммобилизуют на одной колонке (например, содержащей хроматографический матрикс). Например, общее количество отобранных клеток из образца иммобилизуют на одной колонке, и иммобилизованные клетки на одной колонке инкубируют в стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления, отобранные клетки иммобилизуют на двух колонках (например, где каждая содержит хроматографический матрикс). Например, общее количество отобранных клеток из образца иммобилизуют на двух колонках (например, каждая колонка (например, хроматографический матрикс) содержит половину или приблизительно половину общего количества клеток, иммобилизованных на ней), и иммобилизованные клетки на двух колонках инкубируют в стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки (например,

T-клетки), иммобилизованные на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе), стимулируют, например, инкубируют в стимулирующих условиях, например, в присутствии стимулирующего средства, при плотности точно, приблизительно или по меньшей мере $0,01 \times 10^6$ клеток/мл, $0,1 \times 10^6$ клеток/мл, $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, $1,0 \times 10^6$ клеток/мл, $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, $2,0 \times 10^6$ клеток/мл, $2,5 \times 10^6$ клеток/мл, $3,0 \times 10^6$ клеток/мл, $4,0 \times 10^6$ клеток/мл, $5,0 \times 10^6$ клеток/мл, 10×10^6 клеток/мл, 50×10^6 клеток/мл, 75×10^6 клеток/мл, 100×10^6 клеток/мл, 125×10^6 клеток/мл, 150×10^6 клеток/мл или 200×10^6 клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки (например, T-клетки), иммобилизованные на стационарной фазе, стимулируют или подвергают стимуляции, например, инкубировали в стимулирующих условиях, например, в присутствии стимулирующего средства, при плотности точно или приблизительно 100 ± 25 миллионов клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки (например, T-клетки), иммобилизованные на стационарной фазе, стимулируют или подвергают стимуляции, например, инкубировали в стимулирующих условиях, например, в присутствии стимулирующего средства, при плотности точно, приблизительно или по меньшей мере $3,0 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, отобранные клетки представляют собой жизнеспособные клетки.

[0174] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство или стимулирующий реагент, включающий стимулирующие средства, добавляют в колонку в концентрации точно, приблизительно или по меньшей мере 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3 мкг на 1×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство или стимулирующий реагент, включающий стимулирующие средства, добавляют в колонку, содержащую иммобилизованные клетки, в концентрации точно, приблизительно или по меньшей мере 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25 мкг на 1×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство или стимулирующий реагент, включающий стимулирующие средства, добавляют в колонку в концентрации точно или приблизительно 1-2 мкг на 1×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент представляет собой олигомерный стимулирующий реагент. В некоторых вариантах осуществления олигомерный стимулирующий реагент добавляют в колонку, содержащую иммобилизованные клетки, в концентрации между точно или приблизительно 1-2 мкг на 1×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, 5×10^8 олигомерных стимулирующих реагентов добавляют в колонку, содержащую иммобилизованные клетки. В случаях, когда две или более колонок содержат иммобилизованные клетки для стимуляции, концентрацию или количество стимулирующего средства или стимулирующего реагента, включающего стимулирующие средства (например, олигомерного стимулирующего реагента), описанные в настоящем описании, добавляют или наносят в каждую колонку.

[0175] В некоторых вариантах осуществления, условия для стимуляции могут включать одно или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, средств, например, питательных веществ,

аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы, и любые другие средства, разработанные для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления, температура составляет точно или приблизительно 37°C. В некоторых вариантах осуществления, содержание кислорода и диоксида углерода контролируют с использованием газообмена.

[0176] В конкретных вариантах осуществления, стимулирующие условия включают инкубацию клеток, например, отобранных клеток из образца, с использованием и/или в присутствии одного или нескольких цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные человеческие цитокины. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов связывают и/или являются способными связывать рецепторы, которые экспрессируются отобранными клетками и/или являются эндогенными для отобранных клеток (например, Т-клеток). В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают член семейства цитокинов с 4-альфа-спиральным пучком. В некоторых вариантах осуществления, члены семейства цитокинов с 4-альфа-спиральным пучком включают, но без ограничения, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин 12 (IL-12), интерлейкин 15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-15. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-7. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-2.

[0177] В конкретных вариантах осуществления, количество или концентрацию одного или нескольких цитокинов измеряют и/или оценивают количественно с использованием международных единиц (МЕ). Международные единицы можно использовать для количественной оценки витаминов, гормонов, цитокинов, вакцин, продуктов крови, и сходных биологически активных веществ. В некоторых вариантах осуществления, МЕ представляют собой или включают единицы измерения активности биологических препаратов посредством сравнения с международными эталонными стандартами конкретных массы и силы например, 1-м международным стандартом WHO для IL-2 человека, 86/504. Международные единицы являются единственным признанным и стандартизованным способом регистрации единиц биологической активности, опубликованным и выведенным в результате проведения международных совместных исследований. В конкретных вариантах осуществления, МЕ для популяции, образца или источника цитокина можно получать посредством сравнения тестирования продукта с аналогичным стандартным продуктом WHO. Например, в некоторых вариантах

осуществления, МЕ/мг популяции, образца или источника человеческого рекомбинантного IL-2, IL-7 или IL-15 сравнивают с стандартным продуктом WHO IL-2 (код NIBSC: 86/500), с стандартным продуктом WHO IL-17 (код NIBSC: 90/530) и с стандартным продуктом WHO IL-15 (код NIBSC: 95/554), соответственно.

[0178] В некоторых вариантах осуществления, биологическая активность в МЕ/мг является эквивалентной (ED50 в нг/мл)-1 x106. В конкретных вариантах осуществления, ED50 рекомбинантного человеческого IL-2 или IL-15 является эквивалентной концентрации, необходимой для половины максимальной стимуляции пролиферации клетки (расщепления ХТТ) с использованием клеток СТЛЛ-2. В конкретных вариантах осуществления, ED50 рекомбинантного человеческого IL-7 является эквивалентной концентрации, необходимой для половины максимальной стимуляции пролиферации активированных РНА лимфоцитов периферической крови человека. Подробности относительно анализов и расчетов МЕ для IL-2 обсуждают в Wadhwa et al., *Journal of Immunological Methods* (2013), 379 (1-2): 1-7; и Gearing and Thorpe, *Journal of Immunological Methods* (1988), 114 (1-2): 3-9; подробности относительно анализов и расчетов МЕ для IL-15 обсуждают в Soman et al. *Journal of Immunological Methods* (2009) 348 (1-2): 83-94.

[0179] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки из образца, стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии цитокина, например, рекомбинантного человеческого цитокина, в концентрации между 1 МЕ/мл и 1000 МЕ/мл, между 10 МЕ/мл и 50 МЕ/мл, между 50 МЕ/мл и 100 МЕ/мл, между 100 МЕ/мл и 200 МЕ/мл, между 100 МЕ/мл и 500 МЕ/мл, между 250 МЕ/мл и 500 МЕ/мл или между 500 МЕ/мл и 1000 МЕ/мл.

[0180] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки из образца, стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии рекомбинантного IL-2, например, человеческого рекомбинантного IL-2, в концентрации между 1 МЕ/мл и 500 МЕ/мл, между 10 МЕ/мл и 250 МЕ/мл, между 50 МЕ/мл и 200 МЕ/мл, между 50 МЕ/мл и 150 МЕ/мл, между 75 МЕ/мл и 125 МЕ/мл, между 100 МЕ/мл и 200 МЕ/мл или между 10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки из образца, стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии рекомбинантного IL-2 в концентрации точно или приблизительно 50 МЕ/мл, 60 МЕ/мл, 70 МЕ/мл, 80 МЕ/мл, 90 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 110 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 130 МЕ/мл, 140 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 160 МЕ/мл, 170 МЕ/мл, 180 МЕ/мл, 190 МЕ/мл или 100 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки из образца, стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно или приблизительно 100 МЕ/мл рекомбинантного IL-2, например, человеческого рекомбинантного IL-2.

[0181] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки из образца, стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии рекомбинантного IL-7, например, человеческого рекомбинантного IL-7, в концентрации

между 100 МЕ/мл и 2000 МЕ/мл, между 500 МЕ/мл и 1000 МЕ/мл, между 100 МЕ/мл и 500 МЕ/мл, между 500 МЕ/мл и 750 МЕ/мл, между 750 МЕ/мл и 1000 МЕ/мл, или между 550 МЕ/мл и 650 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, входные клетки, стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии IL-7 в концентрации точно или приблизительно 50 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 250 МЕ/мл, 300 МЕ/мл, 350 МЕ/мл, 400 МЕ/мл, 450 МЕ/мл, 500 МЕ/мл, 550 МЕ/мл, 600 МЕ/мл, 650 МЕ/мл, 700 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 800 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 750 МЕ/мл или 1000 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки из образца, стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно или приблизительно 600 МЕ/мл рекомбинантного IL-7, например, человеческого рекомбинантного IL-7.

[0182] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки из образца, стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии рекомбинантного IL-15, например, человеческого рекомбинантного IL-15, в концентрации между 1 МЕ/мл и 500 МЕ/мл, между 10 МЕ/мл и 250 МЕ/мл, между 50 МЕ/мл и 200 МЕ/мл, между 50 МЕ/мл и 150 МЕ/мл, между 75 МЕ/мл и 125 МЕ/мл, между 100 МЕ/мл и 200 МЕ/мл, или между 10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, клетки из входной популяции, стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии рекомбинантных IL-15 в концентрации точно или приблизительно 50 МЕ/мл, 60 МЕ/мл, 70 МЕ/мл, 80 МЕ/мл, 90 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 110 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 130 МЕ/мл, 140 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 160 МЕ/мл, 170 МЕ/мл, 180 МЕ/мл, 190 МЕ/мл, или 200 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки из образца, стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно или приблизительно 100 МЕ/мл рекомбинантного IL-15, например, человеческого рекомбинантного IL-15.

[0183] В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки из образца, стимулируют или подвергали стимуляции в стимулирующих условиях в присутствии IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых вариантах осуществления, IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются рекомбинантными. В конкретных вариантах осуществления, IL-2, IL-7, и/или IL-15 являются человеческими. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают человеческие рекомбинантные IL-2, IL-7 и/или IL-15. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки из образца, стимулируют или подвергали стимуляции в стимулирующих условиях в присутствии рекомбинантных IL-2, IL-7 и IL-15. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергали стимуляции в стимулирующих условиях в присутствии рекомбинантного IL-2, точно или приблизительно 100 МЕ/мл, рекомбинантного IL-7, точно или приблизительно 600 МЕ/мл, и рекомбинантного IL-15, точно или приблизительно 100 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия дополнительно включают глутамин.

[0184] Условия могут включать одно или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, средств, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы, и любые другие средства, разработанные для активации клеток.

[0185] В некоторых аспектах, стимуляцию проводят в соответствии с такими способами, как описанные 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.

[0186] В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию проводят в бессывороточных средах. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой культуральную среду определенного или точно определенного состава. В конкретных вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой контролируемую культуральную среду, которая была переработана, например, фильтрована, для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит белки. В конкретных вариантах осуществления, бессывороточная среда может содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы прикрепления.

[0187] В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию проводят в бессывороточных средах, описанных в настоящем описании в разделе III или в РСТ/US2018/064627. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду (например, базовую среду для размножения Т-клеток OpTmizer™ (ThermoFisher), дополненную одной или несколькими добавками. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько добавок является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду, дополненную одним или несколькими дополнительными компонентами для поддержания, размножения, и/или активации клетки (например, Т-клетки), такими, как представленные посредством дополнительной добавки (например, добавки для размножения Т-клеток OpTmizer™ (ThermoFisher)). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит заменяющую сыворотку добавку, например, заменитель сыворотки для иммуноцитов, например, ThermoFisher, #A2596101, заменитель сыворотки для иммуноцитов CTS™ или заменитель сыворотки для иммуноцитов описанный в Smith et al. *Clin Transl Immunology.* 2015 Jan; 4(1): e31. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит свободную форму аминокислоты, такую как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит дипептидную форму L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин), такую как дипептид в Glutamax™ (ThermoFisher). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит один или несколько

рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный человеческий IL-2, рекомбинантный человеческий IL-7 и/или рекомбинантный человеческий IL-15.

[0188] В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию, например, инкубацию в стимулирующих условиях, проводят при комнатной температуре (например, точно или приблизительно 23°C). В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию, например, инкубацию в стимулирующих условиях, проводят при точно или приблизительно 37°C.

[0189] Способы, представленные в настоящем описании, позволяют сбор или элюцию отобранных клеток из хроматографической колонки без добавления конкурентного средства или свободного связывающего средства для элюции клеток из стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, стимуляция на колонке вызывает открепление отобранных клеток от колонки. В некоторых вариантах осуществления, например, когда стимулирующие средства или стимулирующий реагент, включающий стимулирующие средства, не связаны, например, напрямую или опосредованно, со стационарной фазой хроматографической колонки, открепленные клетки могут оставаться связанными с стимулирующими средствами или стимулирующим реагентом, содержащим стимулирующие средства. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, открепленная клетка может оставаться в стимулирующих условиях после открепления от колонки и/или при сборе и/или элюции. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия поддерживают в течение некоторого периода времени после удаления (например, сбора или элюции) из колонки. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть стимуляции в присутствии стимулирующих средств или стимулирующего реагента, включающего стимулирующие средства, проводят во внутренней полости камеры для центрифугирования, например, при вращении в центрифуге, например, как описано в Международной патентной публикации номер WO2016/073602.

[0190] В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию, проводимую после сбора или элюции клеток из колонки, 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 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. В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию, проводимую после сбора или элюции клеток из колонки, проводят в условиях перемешивания, например,

движения. В конкретных вариантах осуществления, стимуляцию проводят в статических условиях, таких как условия, не включающие центрифугирование, встряхивание, вращение, движение или перфузию, например, непрерывную или полунепрерывную перфузию сред.

[0191] В некоторых вариантах осуществления, элюированные и/или собранные клетки, например, клетки, все еще связанные с стимулирующим средством или стимулирующим реагентом, включающим стимулирующие средства, переносят (например, переносят в стерильных условиях) в контейнер, такой как пакет или флакон, и помещают в инкубатор. В конкретных вариантах осуществления, инкубатор устанавливают на, приблизительно на или по меньшей мере на 16°C, 24°C или 35°C. В некоторых вариантах осуществления, инкубатор устанавливают на 37°C, приблизительно на 37°C или на 37°C \pm 2°C, \pm 1°C, \pm 0,5°C или \pm 0,1°C. В конкретных вариантах осуществления, стимуляцию в статических условиях проводят в культуральном пакете, помещенном в инкубатор. В некоторых вариантах осуществления, стимуляцию в условиях движения проводят в культуральном пакете, помещенном в инкубатор. В некоторых вариантах осуществления, культуральный пакет состоит из полиолефиновой газопроницаемой пленки с сеткой с одной стороны, которая позволяет адгезию моноцитов, если они присутствуют, на поверхности пакета.

1. Использование стимулирующих средств и реагентов для стимуляции на колонке

[0192] В конкретных аспектах, стимулирующие условия включают инкубацию клетки-мишени (например, Т-клетки), иммобилизованной на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе), с одним или несколькими стимулирующими средствами. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие средства содержатся в стимулирующем реагенте. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие средства связаны, напрямую или опосредованно, с хроматографическим матриксом (например, стационарной фазой) хроматографической колонки. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие средства связаны опосредованно с хроматографическим матриксом (например, стационарной фазой) хроматографической колонки, например, посредством реагента для отбора, как описано в настоящем описании, например, в разделе II-A и/или разделе I-B, или стимулирующего реагента, как описано в настоящем описании, например, в разделе II-A и/или разделе I-C-1b. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие средства содержатся в стимулирующем реагенте. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент связан с хроматографическим матриксом (например, стационарной фазой) хроматографической колонки. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент ковалентно связан с хроматографическим матриксом (например, стационарной фазой). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство нековалентно связано с хроматографическим матриксом (например, стационарной фазой).

[0193] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент не является связанным с или ассоциированным с твердой подложкой, стационарной фазой, бусиной, микрочастицей, магнитной частицей и/или матриксом (например, хроматографическим матриксом). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент является гибким, не содержит металлический или магнитный кор, состоит полностью или преимущественно из органического мультимера, и/или не является жестким. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент является растворимым. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент представляет собой олигомерный стимулирующий реагент (см., например, раздел I-C-1b). В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент является растворимым.

[0194] В конкретных вариантах осуществления, начало стимуляции происходит, когда клетки инкубируют или приводят в контакт с стимулирующим средством. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, где стимулирующее средство связано, напрямую или опосредованно, например, посредством реагента для отбора или стимулирующего реагента, с хроматографическим матриксом (например, стационарной фазой) колонки, начало стимуляции происходит, когда образец, содержащий клетки-мишени добавляют в хроматографический матрикс (например, стационарную фазу) колонки. В некоторых вариантах осуществления, когда стимулирующие средства, содержащиеся в стимулирующем реагенте, не ассоциированы (например, не связаны) с хроматографическим матриксом (например, стационарной фазой), начало стимуляции происходит, когда стимулирующий реагент (например, олигомерный стимулирующий реагент) добавляют к стационарной фазе, на которой иммобилизованы клетки-мишени из образца. В некоторых вариантах осуществления, когда стимулирующее средство не связано, напрямую или опосредованно, с хроматографическим матриксом (например, стационарной фазой) и не содержится в стимулирующем реагенте (например, олигомерном стимулирующем реагенте), начало стимуляции происходит, когда стимулирующее средство добавляют в хроматографический матрикс (например, стационарную фазу).

[0195] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия или стимулирующие реагенты (например, олигомерные стимулирующие реагенты) включают одно или несколько стимулирующих средств, которое является способным активировать внутриклеточный передающий сигналы домен из комплекса TCR. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько стимулирующих средств является способным активировать внутриклеточный передающий сигналы домен из комплекса TCR. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство, как предусмотрено по настоящему изобретению, может включать, но без ограничения, РНК, ДНК, белки (например, ферменты), антигены, поликлональные антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител, 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 конкретных вариантах осуществления, желательная мишень представляет собой Т-клеточную костимулирующую молекулу, например, CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab.

[0196] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент (например, олигомерный стимулирующий реагент) содержит одно или несколько стимулирующих средств, связывающих одну или несколько 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, MHC I, MHC II, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30 л, 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 этих макромолекул или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство специфически связывает одну или несколько из следующих макромолекул на клетке (например, Т-клетке): CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO.

[0197] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство представляет собой антитело, которое связывает и/или узнает один или несколько компонентов Т-клеточного рецептора. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующее средство представляет собой антитело против CD3. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующее средство представляет собой антитело, которое связывает и/или узнает костимулирующую молекулу. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующее средство представляет собой антитело против CD28. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит антитело против CD28 и антитело против CD3 (например, стимулирующие средства). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит одно или несколько стимулирующих средств. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит первое и второе стимулирующее средство. В некоторых вариантах осуществления, первое стимулирующее средство представляет собой антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, например, как описано в настоящем описании, и второе стимулирующее средство представляет собой антитело против CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент, например, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, первое стимулирующее средство представляет собой Fab против CD3, например, как описано в настоящем описании, и второе стимулирующее средство представляет собой Fab против CD28, например, как описано в настоящем описании.

[0198] В некоторых вариантах осуществления, например, когда стимулирующее средство не связано со стимулирующим реагентом (например, олигомерным стимулирующим реагентом) или реагентом для отбора, стимулирующее средство представляет собой антитело, двухвалентный фрагмент антитела, $F(ab)_2$, или двухвалентный одноцепочечный фрагмент Fv . В некоторых вариантах осуществления, РМА/иономицин можно использовать для стимуляции клеток.

[0199] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки из образца, стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии соотношения стимулирующего средства к клеткам точно или приблизительно 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,5:1, 1,25:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,75:1, 0,67:1, 0,5:1, 0,3:1 или 0,2:1. В конкретных вариантах осуществления, соотношение стимулирующего средства к клеткам составляет между 2,5:1 и 0,2:1, между 2:1 и 0,5:1, между 1,5:1 и 0,75:1, между 1,25:1 и 0,8:1, между 1,1:1 и 0,9:1. В конкретных вариантах осуществления, соотношение стимулирующего средства к клеткам составляет приблизительно 1:1 или составляет 1:1. В конкретных вариантах осуществления, соотношение стимулирующего реагента к клеткам составляет приблизительно 0,3:1 или составляет 0,3:1. В конкретных вариантах осуществления, соотношение стимулирующего реагента к клеткам составляет приблизительно 0,2:1 или составляет 0,2:1.

[0200] В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно, приблизительно или по меньшей мере 0,01 мкг, 0,02 мкг, 0,03 мкг, 0,04 мкг, 0,05 мкг, 0,1 мкг, 0,2 мкг, 0,3 мкг, 0,4 мкг, 0,5 мкг, 0,75 мкг, 1 мкг, 1,2 мкг, 1,4 мкг, 1,6 мкг, 1,8 мкг, 2 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг, 6 мкг, 7 мкг, 8 мкг, 9 мкг, или 10 мкг стимулирующего реагента на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно или приблизительно 4 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно или приблизительно 3 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно или приблизительно 2,5 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно или приблизительно 2 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно или приблизительно 1,8 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно или приблизительно 1,6 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно или приблизительно 1,4 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно или приблизительно 1,2 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно или приблизительно 1 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно

или приблизительно 0,8 мкг на 10^6 клеток. В различных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергали стимуляции в присутствии точно или приблизительно 0,8 мкг на 10^6 клеток.

а. Стимулирующие средства

[0201] Как описано выше, в конкретных аспектах, в способах, представленных в настоящем описании, используют стимулирующее средство. В некоторых вариантах осуществления, средство, как описано в разделе II-B, представляет собой стимулирующее средство. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство связывает молекулу на поверхности клетки, где связывание между стимулирующим средством и молекулой является способным индуцировать, доставлять или модулировать стимулирующий сигнал в клетках. В некоторых случаях, молекула клеточной поверхности (например, рецептор) представляет собой передающую сигналы молекулу. В некоторых таких случаях, стимулирующее средство является способным специфически связывать передающую сигналы молекулу, экспрессированную одной или несколькими клетками-мишенями (например, Т-клетками). В некоторых случаях, стимулирующее средство представляет собой любое средство способное индуцировать или доставлять стимулирующий сигнал в клетке (например, Т-клетке) при связывании с молекулой клеточной поверхности, такой как рецептор. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий сигнал может являться иммуностимулирующим, в этом случае, стимулирующее средство является способным индуцировать, доставлять или модулировать сигнал, который вовлечен в или который стимулирует иммунный ответ клетки (например, Т-клетки), например, увеличивает пролиферацию или размножение иммуноцита, активацию иммуноцита, дифференцировку иммуноцита, секрецию цитокина, цитотоксическую активность или один или несколько других видов функциональной активности иммуноцита. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий сигнал может являться ингибирующим, в этом случае, стимулирующее средство является способным индуцировать, доставлять или модулировать стимулирующий сигнал в клетке (например, Т-клетке), который вовлечен в или который ингибирует иммунный ответ, например, ингибирует или уменьшает пролиферацию или размножение иммуноцита, активацию иммуноцита, дифференцировку иммуноцита, секрецию цитокина, цитотоксическую активность или один или несколько других видов функциональной активности иммуноцита.

[0202] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство представляет собой первое стимулирующее средство. В некоторых вариантах осуществления, первое стимулирующее средство связывает молекулу рецептора на поверхности отобранных клеток из образца. Таким образом, в некоторых случаях, первое стимулирующее средство доставляет, индуцирует или модулирует стимулирующий сигнал. В некоторых аспектах, доставка, индукция или модуляция стимулирующего сигнала посредством первого стимулирующего средства осуществляет стимуляцию клеток. Таким образом, в некоторых случаях, первое стимулирующее средство доставляет

стимулирующий сигнал или подает первичный сигнал активации клеткам, таким образом, стимулируя и/или активируя клетки. В некоторых вариантах осуществления, первое стимулирующее средство дополнительно индуцирует понижающую регуляцию селективного маркера. в рамках изобретения, понижающая регуляция может включать уменьшение экспрессии, например, экспрессии на клеточной поверхности, селективного маркера по сравнению с более ранней временной точкой.

[0203] В некоторых вариантах осуществления, клетки-мишени (например, Т-клетки) содержат комплексы TCR/CD3 и костимулирующие молекулы, такие как CD28. В этом случае, первое стимулирующее средство связывает комплекс TCR/CD3, таким образом, доставляет стимулирующий сигнал (например, первичный сигнал, например, первичный сигнал активации) в Т-клетках, и второе стимулирующее средство связывает костимулирующую молекулу CD28. В конкретных аспектах, первое стимулирующее средство и/или второе стимулирующее средство дополнительно индуцирует понижающую регуляцию селективного маркера (например, селективного маркера, используемого для иммобилизации клеток-мишеней (например, Т-клеток)).

[0204] В некоторых вариантах осуществления, первое стимулирующее средство доставляет ассоциированный с комплексом TCR/CD3 стимулирующий сигнал (например, первичный сигнал) в клетки, например, Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, первое стимулирующее средство специфически связывает молекулу, содержащую иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. В некоторых аспектах, первое стимулирующее средство специфически связывает CD3. В некоторых случаях, первое стимулирующее средство, которое специфически связывает CD3, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против CD3, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против CD3, одновалентного фрагмента антитела из антитела против CD3 и белковой связывающей CD3 молекулы с антителоподобными свойствами связывания. Двухвалентный фрагмент антитела может представлять собой F(ab')₂-фрагмент, или двухвалентный одноцепочечный фрагмент Fv, в то время как одновалентный фрагмент антитела может быть выбран из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента Fv и одноцепочечного фрагмента Fv (scFv). В некоторых случаях, белковая связывающая CD3 молекула с антителоподобными свойствами связывания может представлять собой аптамер, мутеин на основе полипептида из семейства липокалинов, глутело, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллинового каркаса, аднектин или авимер.

[0205] В некоторых вариантах осуществления, фрагмент Fab против CD3 может происходить из связывающего CD3 моноклонального антитела, продуцированного линией клеток гибридомы ОКТ3 (ATCC® CRL-8001™; см. также Патент США No. 4361549). Варибельный домен тяжелой цепи и варибельный домен легкой цепи антитела против CD3 ОКТ3 описаны в Arakawa et al J. Biochem. 120, 657-662 (1996) и содержат аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 31 и 32, соответственно. В

некоторых вариантах осуществления, Fab против CD3 содержит CDR вариабельной тяжелой и легкой цепей, указанных в SEQ ID NO: 31 и 32, соответственно.

[0206] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство представляет собой второе стимулирующее средство. В некоторых вариантах осуществления, второе стимулирующее средство связывает молекулу на поверхности клеток, такую как молекула клеточной поверхности, например, молекула рецептора. В некоторых вариантах осуществления, второе стимулирующее средство является способным усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал, доставляемый через молекулу, связанную посредством первого стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, второе стимулирующее средство доставляет, индуцирует или модулирует стимулирующий сигнал, например, второй или дополнительный стимулирующий сигнал. В некоторых аспектах, второе стимулирующее средство усиливает или стимулирует стимулирующий сигнал, индуцированный посредством первого стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, второе стимулирующее средство связывает вспомогательную молекулу и/или может стимулировать или индуцировать вспомогательный или вторичный стимулирующий сигнал в клетке. В некоторых аспектах, второе стимулирующее средство связывает костимулирующую молекулу и/или подает костимулирующий сигнал.

[0207] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство, которое может представлять собой второе стимулирующее средство, связывает, например, специфически связывает, вторую молекулу, которая может представлять собой костимулирующую молекулу, вспомогательную молекулу, рецептор цитокина, рецептор хемокина, молекулу иммунной контрольной точки, или член семейства TNF или семейства рецепторов TNF.

[0208] В некоторых вариантах осуществления, молекула на клетке, например, T-клетке, может представлять собой CD28, и стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство) специфически связывает CD28. В некоторых аспектах, стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство), которое специфически связывает CD28, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против CD28, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против CD28, одновалентного фрагмента антитела из антитела против CD28 и белковой связывающей CD28 молекулы с антителоподобными свойствами связывания. Двухвалентный фрагмент антитела может представлять собой F(ab')₂-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный фрагмент Fv, в то время как одновалентный фрагмент антитела может быть выбран из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента Fv и одноцепочечного фрагмента Fv (scFv). Белковая связывающая CD28 молекула с антителоподобными свойствами связывания может представлять собой аптамер, мутеин на основе полипептида из семейства липокалинов, глутело, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллинового каркаса, аднектин и авимер.

[0209] В некоторых вариантах осуществления, фрагмент Fab против CD28 может происходить из антитела CD28.3 (депонированного как синтетическая конструкция одноцепочечного Fv под No. доступа в GenBank AF451974.1; см. также Vanhove et al, BLOOD, 15 July 2003, Vol. 102, No. 2, pages 564-570), переменная тяжелая и легкая цепи которого содержат SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, Fab против CD28 содержит CDR переменных тяжелой и легкой цепей, указанных в SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно.

[0210] В некоторых вариантах осуществления, молекула на клетке, например, Т-клетке, представляет собой CD90, и стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство) специфически связывает CD90. В некоторых аспектах, стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство), которое специфически связывает CD90, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против CD90, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против CD90, одновалентного фрагмента антитела из антитела против CD90 и белковой связывающей CD90 молекулы с антителоподобными свойствами связывания. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может происходить из любого антитела, известного в данной области. См., например, антитело против CD90 G7 (Biolegend, кат. no. 105201).

[0211] В некоторых вариантах осуществления, молекула на клетке, например, Т-клетке, представляет собой CD95, и стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство) специфически связывает CD95. В некоторых аспектах, стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство), которое специфически связывает CD95, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против CD95, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против CD95, одновалентного фрагмента антитела из антитела против CD95 и белковой связывающей CD95 молекулы с антителоподобными свойствами связывания. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может происходить из любого антитела, известного в данной области. Например, в некоторых аспектах, антитело против CD90 может представлять собой моноклональное мышинное антитело против CD95 человека CH11 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), или может представлять собой mAb против CD95 7C11 или антитело против APO-1, такое, как описано в Paulsen et al. Cell Death & Differentiation 18,4 (2011): 619-631.

[0212] В некоторых вариантах осуществления, молекула на клетке, например, Т-клетке, или В-клетке, может представлять собой CD137, и стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство) специфически связывает CD137. В некоторых аспектах, стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство), которое специфически связывает CD137, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против CD137, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против CD137, одновалентного фрагмента антитела из антитела против CD137 и белковой связывающей

CD137 молекулы с антителоподобными свойствами связывания. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может происходить из любого антитела, известного в данной области. Например, антитело против CD137 может представлять собой LOB12, IgG2a или LOB12.3, IgG1, как описано в Taraban et al. *Eur J Immunol.* 2002 Dec;32(12):3617-27. См. также, например, US6569997, US6303121, Mittler et al. *Immunol Res.* 2004;29(1-3):197-208.

[0213] В некоторых вариантах осуществления, молекула на клетке, например, В-клетке, может представлять собой CD40, и стимулирующее средство, например, стимулирующее средство, (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство, например, второе стимулирующее средство) специфически связывает CD40. В некоторых аспектах, стимулирующее средство (которое может представлять собой второе стимулирующее средство, например, второе стимулирующее средство), которое специфически связывает CD40, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против CD40, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против CD40, одновалентного фрагмента антитела из антитела против CD40 и белковой связывающей CD40 молекулы с антителоподобными свойствами связывания.

[0214] В некоторых вариантах осуществления, молекула на клетке, например, Т-клетке, может представлять собой CD40L (CD154), и стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство) специфически связывает CD40L. В некоторых аспектах, стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство), которое специфически связывает CD40L, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против CD40L, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против CD40L, одновалентного фрагмента антитела из антитела против CD40L и белковой связывающей CD40L молекулы с антителоподобными свойствами связывания. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может происходить из любого антитела, известного в данной области. Например, антитело против CD40L может, в некоторых аспектах, представлять собой Nu5C8, как описано в Blair et al. *JEM* vol. 191 no. 4 651-660. См. также, например, WO1999061065, US20010026932, US7547438, WO2001056603.

[0215] В некоторых вариантах осуществления, молекула на клетке, например, Т-клетке, может представлять собой индуцируемый Т-клеточный костимулятор (ICOS), и стимулирующее средство, (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство) специфически связывает ICOS. В некоторых аспектах, стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство), которое специфически связывает ICOS, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против ICOS, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против ICOS, одновалентного фрагмента антитела из антитела против ICOS и белковой связывающей ICOS молекулы с антителоподобными свойствами связывания. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может происходить из любого антитела,

известного в данной области. См., например, US20080279851 и Deng et al. *Hybrid Hybridomics*. 2004 Jun;23(3):176-82.

[0216] В некоторых вариантах осуществления, молекула на клетке, например, Т-клетке, может представлять собой линкер для активации Т-клеток (LAT), и стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство) специфически связывает LAT. В некоторых аспектах, стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство), которое специфически связывает LAT, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против LAT, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против LAT, одновалентного фрагмента антитела из антитела против LAT и белковой связывающей LAT молекулы с антителоподобными свойствами связывания. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может происходить из любого антитела, известного в данной области.

[0217] В некоторых вариантах осуществления, молекула на клетке, например, Т-клетке, может представлять собой CD27, и стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство) специфически связывает CD27. В некоторых аспектах, стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство), которое специфически связывает CD27, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против CD27, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против CD27, одновалентного фрагмента антитела из антитела против CD27 и белковой связывающей CD27 молекулы с антителоподобными свойствами связывания. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может происходить из любого антитела, известного в данной области. См., например, WO2008051424.

[0218] В некоторых вариантах осуществления, молекула на клетке, например, Т-клетке, может представлять собой OX40, и стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство) специфически связывает OX40. В некоторых аспектах, стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство), которое специфически связывает OX40, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против OX40, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против OX40, одновалентного фрагмента антитела из антитела против OX40 и белковой связывающей OX40 молекулы с антителоподобными свойствами связывания. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может происходить из любого антитела, известного в данной области. См., например, WO2013038191, Melero et al. *Clin Cancer Res*. 2013 Mar 1;19(5):1044-53.

[0219] В некоторых вариантах осуществления, молекула на клетке, например, Т-клетке, может представлять собой HVEM, и стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство) специфически связывает HVEM. В некоторых аспектах, стимулирующее средство (например, которое может представлять собой второе стимулирующее средство), которое специфически связывает

HVEM, может быть выбрано из группы, состоящей из антитела против HVEM, двухвалентного фрагмента антитела из антитела против HVEM, одновалентного фрагмента антитела из антитела против HVEM и белковой связывающей HVEM молекулы с антителоподобными свойствами связывания. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может происходить из любого антитела, известного в данной области. См., например, WO2006054961, WO2007001459, Park et al. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Feb;61(2):203-14.

[0220] В любом из вышеуказанных примеров, двухвалентный фрагмент антитела может представлять собой (Fab)₂'-фрагмент, или двухвалентный одноцепочечный фрагмент Fv, в то время как одновалентный фрагмент антитела может быть выбран из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента Fv и одноцепочечного фрагмента Fv (scFv). В любом из вышеуказанных примеров, белковая связывающая молекула с антителоподобными свойствами связывания может представлять собой аптамер, мутеин на основе полипептида из семейства липокалинов, глутело, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллинового каркаса, аднектин и авимер.

[0221] В некоторых аспектах, стимулирующее средство специфически нацелено на молекулу, экспрессированную на поверхности клеток-мишеней, где молекула представляет собой TCR, химерный рецептор антигена, или молекулу, содержащую иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Например, молекула, экспрессированная на поверхности клетки-мишени, выбрана из комплекса Т-клеточного или В-клеточного рецептора антигена, цепи CD3, CD3-дзета, антигенсвязывающей части Т-клеточного рецептора или В-клеточного рецептора, или химерного рецептора антигена. В некоторых случаях, стимулирующее средство нацелено на комплексы пептид:МНС класса I.

[0222] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство связывает His-меченный внеклеточный домен молекулы, экспрессированной на поверхности клеток-мишеней. В некоторых случаях, стимулирующее средство содержит пептидную последовательность Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (также называемую Strep-меткой® II, указанной в SEQ ID NO: 8), конъюгированную с заряженным trisNTA никеля (также называемую His-STREPPER или адаптер His/Strep-метка®II). В некоторых вариантах осуществления, молекула, экспрессированная на поверхности клеток-мишеней, которая является His-меченной, представляет собой CD19.

[0223] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство специфически связывает часть антитела из рекомбинантного рецептора, например, CAR. В некоторых случаях, часть антитела из рекомбинантного рецептора включает по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, такую как шарнирная область, например, шарнирная область IgG4, и/или CH1/CL и/или область Fc. В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть происходит из IgG человека, такого как IgG4 или IgG1. В некоторых случаях, реагент нагружен αIgG, узнающим спейсер IgG4.

[0224] 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 Т-клеточную костимулирующую молекулу, например, CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

[0225] В некоторых вариантах осуществления, например, когда стимулирующее средство не связано со стимулирующим реагентом (например, олигомерным стимулирующим реагентом) или реагентом для отбора, стимулирующее средство представляет собой антитело, двухвалентный фрагмент антитела, F(ab)₂, или двухвалентный одноцепочечный фрагмент Fv. В некоторых вариантах осуществления, когда стимулирующее средство не связано с реагентом, стимулирующее средство не включает партнер по связыванию С.

в. Олигомерные стимулирующие реагенты

[0226] Как предложено выше, в конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит олигомерный стимулирующий реагент, например, реагент мутеин стрептавидина, который является конъюгированным, связанным или соединенным с одним или несколькими стимулирующими средствами. Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления, одно или несколько стимулирующих средств имеют присоединенный связывающий домен или партнер по связыванию (например, партнер по связыванию С), который является способным связывать олигомерный стимулирующий реагент в конкретных участках связывания (например, участке связывания Z). В некоторых вариантах осуществления, множество стимулирующих средств обратимо связаны с олигомерным стимулирующим реагентом. В различных вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент имеет множество конкретных участков связывания, Z, которые, в конкретных вариантах осуществления, обратимо связаны с множеством стимулирующих средств по связывающему домену (например, партнеру по связыванию С). В некоторых вариантах осуществления, количество связанных средств уменьшается или снижается в присутствии конкурентного средства, например, средства, способного также связывать конкретные участки связывания (например, участок связывания Z).

[0227] В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент представляет собой или включает обратимую систему, в которой по меньшей мере одно стимулирующее средство (например, стимулирующее средство, способное подавать сигнал в клетке, такой как Т-клетка) является ассоциированным, например, обратимо ассоциированным, с олигомерным стимулирующим реагентом. Неограничивающие примеры олигомерных стимулирующих реагентов можно обнаружить, например, в Международной публикации патентной заявки PCT No. WO 2018/197949, полное содержание которой приведено в настоящем описании в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, реагент содержит множество участков связывания, способных связывать, например, обратимо связывать стимулирующее средство. В некоторых

случаях, реагент представляет собой олигомерный стимулирующий реагент, имеющий по меньшей мере одно присоединенное средство, способное подавать сигнал (например, стимулирующий сигнал) в клетке, такой как Т-клетка. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство содержит по меньшей мере один участок связывания, например, участок связывания В, который может специфически связывать эпитоп или область молекулы (например, молекулы клеточной поверхности/или рецептора), а также содержит партнер по связыванию, также обозначенный в настоящем описании как партнер по связыванию С, которое специфически связывает по меньшей мере один участок связывания олигомерного стимулирующего 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 обратимым.

[0228] Вещества, которые можно использовать в качестве олигомерных стимулирующих реагентов в таких обратимых системах известны, см., например, Патенты США No. 5168049; 5506121; 6103493; 7776562; 7981632; 8298782; 8735540; 9023604; и Международную публикацию PCT No. WO2013/124474 и WO2014/076277. Неограничивающие примеры реагентов и партнеров по связыванию, способных формировать обратимое взаимодействие, так же как вещества (например, конкурентные средства), способные обращать такое связывание, описаны ниже.

[0229] В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент представляет собой олигомер стрептавидина, мутеин или аналог стрептавидина, авидин, мутеин или аналог авидина (такой как нейтравидин) или их смесь, в которых такой олигомерный стимулирующий реагент содержит один или несколько участков связывания для обратимой ассоциации со связывающим доменом стимулирующего средства (например, партнером по связыванию С). В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен стимулирующего средства может представлять собой биотин, производное или аналог биотина, или связывающий стрептавидин пептид или другую молекулу, способную специфически связывать стрептавидин, мутеин или аналог стрептавидина, авидин или мутеин или аналог авидина.

[0230] В конкретных вариантах осуществления, одно или несколько стимулирующих средств (например, средства, способные подавать сигнал в клетке, такой как Т-клетка, например, как описано в разделе I-C-1a выше) ассоциированы с, например, обратимо связаны с олигомерным стимулирующим реагентом, например, через множество конкретных участков связывания (например, участков связывания Z), присутствующих на олигомерном стимулирующем реагенте. В некоторых случаях, это приводит к получению

стимулирующих средств, аранжированных близко друг к другу, так что эффект авидности может иметь место, если клетку-мишень, имеющую (по меньшей мере две копии) молекулу клеточной поверхности, связываемую или узнаваемую стимулирующим средством, приводят в контакт с средством.

[0231] В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент представляет собой олигомер стрептавидина, олигомер мутеина стрептавидина, олигомер аналога стрептавидина, олигомер авидина, олигомер, состоящий из мутеина авидина или аналога авидина (такого как нейтравидин), или их смеси. В конкретных вариантах осуществления, олигомерные стимулирующие реагенты содержат конкретные участки связывания, которые являются способными связывать связывающий домен (например, партнер по связыванию C) стимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен может представлять собой биотин, производное или аналог биотина, или связывающий стрептавидин пептид, или другую молекулу, способную специфически связывать стрептавидин, мутеин или аналог стрептавидина, авидин или мутеин или аналог авидина. Примеры стрептавидина, мутеина стрептавидина, аналога стрептавидина, авидина, мутеина авидина или аналога авидина (такого как нейтравидин) и молекулы связывающего домена, например, биотин, производное или аналог биотина, или связывающий стрептавидин пептид или другую молекулу, способную специфически связывать стрептавидин, мутеин или аналог стрептавидина, авидин или мутеин или аналог авидина, предусмотренные как содержащие систему олигомерного стимулирующего реагента, описаны в разделе II-A ниже. Способы, представленные в настоящем описании, далее предусматривают, что олигомерный стимулирующий реагент может содержать молекулу, способную связывать олигогистидиновую аффинную метку, глутатион-S-трансферазу, кальмодулин или его аналог, связывающий кальмодулин пептид (CBP), FLAG-пептид, HA-метку, связывающий мальтозу белок (MBP), эпитоп HSV, эпитоп тус и/или биотинилированный белок-носитель (см. раздел II-A).

[0232] В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к олигомерному стимулирующему реагенту, который состоит из и/или содержит множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В конкретных вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, представленный в настоящем описании, содержит множество участков связывания, которые обратимо связывают или способны обратимо связывать одно или несколько стимулирующих средств. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент имеет радиус, например, средний радиус, между 70 нм и 125 нм, включительно; молекулярную массу между 1×10^7 г/моль и 1×10^9 г/моль, включительно; и/или между 1000 и 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, включительно. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент связан, например, обратимо связан с одним или несколькими стимулирующими средствами, такими как средство, которое связывает молекулу, например, рецептор, на поверхности клетки. В конкретных вариантах осуществления, одно или несколько стимулирующих

средств представляют собой средства, описанные в настоящем описании, например, в разделе I-C-1a. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько стимулирующих средств содержит одновалентный участок связывания (например, участок связывания B). В некоторых вариантах осуществления, одновалентный участок связывания связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, одновалентный участок связывания связывает костимулирующую молекулу, например, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, одновалентный участок связывания связывает CD28. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько стимулирующих средств содержат одновалентный участок связывания, способный связывать CD3 и/или CD28. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство представляет собой антитело против CD3 и/или против CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который содержит партнер по связыванию, C, например, связывающий стрептавидин пептид, например, Strep-метку® II. В конкретных вариантах осуществления, одно или несколько стимулирующих средств представляет собой Fab против CD3 и/или против CD28, содержащий партнер по связыванию, например, связывающий стрептавидин пептид, например, Strep-метку® II. В конкретных вариантах осуществления, одно или несколько средств содержат олигомер на основе стрептавидаина, такой как олигомер мутеина стрептавидаина, конъюгированный с меченным Strep Fab против CD3 и меченным Strep Fab против CD28. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент представляет собой любой, как описано в WO2015/158868 или WO2018/197949.

[0233] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к олигомерному стимулирующему реагенту который состоит из и/или содержит множество тетрамеров стрептавидаина или мутеина стрептавидаина. В конкретных вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, представленный в настоящем описании, содержит множество участков связывания, которые обратимо связывают или способны обратимо связывать одно или несколько стимулирующих средств. 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 2×10^8 г/моль, включительно; и/или количество, например, среднее количество, между 500 и 10000 тетрамеров стрептавидаина или мутеина стрептавидаина, включительно. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент связан, например, обратимо связан с одним или несколькими стимулирующими средствами, такими как средство, которое связывает молекулу, например, рецептор, на поверхности клетки. В конкретных вариантах осуществления, одно или несколько стимулирующих средств представляют собой средства, описанные в настоящем описании, например, в разделе I-B-2-a. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее средство представляет собой антитело против CD3 и/или против CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент, например, антитело или

его антигенсвязывающий фрагмент, который содержит партнер по связыванию, С, например, связывающий стрептавидин пептид, например, Strep-метку® II. В конкретных вариантах осуществления, одно или несколько средств представляет собой Fab против CD3 и/или против CD28, содержащий партнер по связыванию, например, связывающий стрептавидин пептид, например, Twin-Strep-метку (например, SEQ ID NO:16).

[0234] В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии точно, приблизительно или по меньшей мере 0,01 мкг, 0,02 мкг, 0,03 мкг, 0,04 мкг, 0,05 мкг, 0,1 мкг, 0,2 мкг, 0,3 мкг, 0,4 мкг, 0,5 мкг, 0,75 мкг, 1 мкг, 1,2 мкг, 1,4 мкг, 1,6 мкг, 1,8 мкг, 2 мкг, 2,2 мкг, 2,4 мкг, 2,6 мкг, 2,8 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг, 6 мкг, 7 мкг, 8 мкг, 9 мкг или 10 мкг олигомерного стимулирующего реагента (например, олигомера на основе стрептавидина, такого как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированный с меченым Strep Fab против CD3 и меченым Strep Fab против CD28) на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии точно или приблизительно 4 мкг олигомерного стимулирующего реагента (например, олигомера на основе стрептавидина, такого как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированный с меченым Strep Fab против CD3 и меченым Strep Fab против CD28) на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии точно или приблизительно 3 мкг олигомерного стимулирующего реагента (например, олигомера на основе стрептавидина, такого как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированный с меченым Strep Fab против CD3 и меченым Strep Fab против CD28) на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии точно или приблизительно 2,75 мкг олигомерного стимулирующего реагента (например, олигомера на основе стрептавидина, такого как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированный с меченым Strep Fab против CD3 и меченым Strep Fab против CD28) на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии точно или приблизительно 2,5 мкг олигомерного стимулирующего реагента (например, олигомера на основе стрептавидина, такого как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированный с меченым Strep Fab против CD3 и меченым Strep Fab против CD28) на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии точно или приблизительно 2,25 мкг олигомерного стимулирующего реагента (например, олигомера на основе стрептавидина, такого как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированный с меченым Strep Fab против CD3 и меченым Strep Fab против CD28) на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии точно или приблизительно 2 мкг олигомерного стимулирующего реагента (например, олигомера на основе стрептавидина, такого как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированный с меченым Strep Fab против CD3 и меченым Strep Fab против CD28) на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии точно

[0235] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, отобранные клетки из образца, стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии соотношения олигомерного стимулирующего реагента к клеткам точно или приблизительно 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,5:1, 1,25:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,75:1, 0,67:1, 0,5:1, 0,3:1 или 0,2:1. В конкретных вариантах осуществления, соотношение олигомерного стимулирующего реагента к клеткам составляет между 2,5:1 и 0,2:1, между 2:1 и 0,5:1, между 1,5:1 и 0,75:1, между 1,25:1 и 0,8:1, между 1,1:1 и 0,9:1. В конкретных вариантах осуществления, соотношение олигомерного стимулирующего реагента к клеткам составляет приблизительно 1:1 или составляет 1:1. В конкретных вариантах осуществления, соотношение олигомерного стимулирующего реагента к клеткам составляет приблизительно 0,3:1 или составляет 0,3:1. В конкретных вариантах осуществления, соотношение олигомерного стимулирующего реагента к клеткам составляет приблизительно 0,2:1 или составляет 0,2:1.

[0236] В конкретных аспектах, в олигомерном стимулирующем реагенте, массовое соотношение между олигомерными частицами и присоединенными средствами составляет приблизительно 3:1. В конкретных аспектах, в олигомерном стимулирующем реагенте, массовое соотношение между олигомерными частицами, присоединенными Fab против CD3 и присоединенными Fab против CD28 составляет приблизительно 3:0,5:0,5. В конкретных аспектах, 4 мкг олигомерного стимулирующего реагента представляет собой или включает 3 мкг олигомерных частиц и 1 мкг присоединенных средств, например, 0,5 мкг Fab против CD3 и 0,5 мкг Fab против CD28. В других примерах, 1,2 мкг олигомерного стимулирующего реагента на 10^6 клеток представляет собой или включает 0,9 мкг олигомерных частиц и 0,3 мкг присоединенных средств, например, 0,15 мкг Fab против CD3 и 0,15 мкг Fab против CD28, на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент добавляют в бессывороточную среду, и стимуляцию проводят в бессывороточной среде, например, как описано в настоящем описании в разделе III или в PCT/US2018/064627.

[0237] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду (например, базовую среду для размножения Т-клеток OpTmizer™ (ThermoFisher), дополненную одной или несколькими добавками. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько добавок является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду, дополненную одним или несколькими дополнительными компонентами для поддержания, размножения, и/или активации клетки (например, Т-клетки), такими, как представленные посредством дополнительной добавки (например, добавки для размножения Т-клеток OpTmizer™ (ThermoFisher)). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит заменяющую сыворотку добавку, например, заменитель сыворотки для иммуноцитов, например, ThermoFisher, #A2596101, заменитель сыворотки для иммуноцитов CTS™, или заменитель сыворотки для иммуноцитов, описанный в Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31. В некоторых вариантах осуществления,

бессывороточная среда дополнительно содержит свободную форму аминокислоты, такую как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит дипептидную форму L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамин), такую как дипептид в Glutamax™ (ThermoFisher). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный человеческий IL-2, рекомбинантный человеческий IL-7 и/или рекомбинантный человеческий IL-15.

D. Элюция

[0238] В аспектах способов, представленных в настоящем описании, элюцию клеток, например, клеток-мишеней (например, Т-клеток) после инкубации со стимулирующим средством из хроматографической колонки осуществляют без использования конкурентного средства или свободного связывающего средства, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, во время инкубации со стимулирующим средством, клетки, иммобилизованные посредством средства для отбора на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе), спонтанно открепляются от средства для отбора. В некоторых вариантах осуществления, спонтанное открепление происходит в пределах одних суток от начала инкубации со стимулирующим средством. В некоторых вариантах осуществления, спонтанное открепление происходит в пределах 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 часов от начала инкубации со стимулирующим средством. В некоторых вариантах осуществления, спонтанное открепление происходит в пределах приблизительно 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 7-24, 8-24, 9-24, 10-24, 11-24, 12-24, 13-24, 14-24, 15-24, 16-24, 17-24, 18-24, 19-24, 20-24, 21-24, 22-24, 23-24, 2-23, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 или 2-3 часов после начала инкубации со стимулирующим средством. В некоторых вариантах осуществления, открепление из колонки происходит в пределах или в пределах приблизительно 4-5 часов, например, 4,5 часов после начала инкубации со стимулирующим средством. В некоторых вариантах осуществления, большинство из множества клеток-мишеней (например, Т-клеток), иммобилизованных посредством средства для отбора на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе), открепляются менее чем за одни сутки от начала инкубации со стимулирующим средством. В некоторых вариантах осуществления, большинство из множества клеток-мишеней (например, Т-клеток), иммобилизованных посредством средства для отбора на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе), открепляются менее чем за 24 часа от начала инкубации со стимулирующим средством. В некоторых вариантах осуществления, большинство из множества клеток-мишеней (например, Т-клеток), иммобилизованных посредством средства для отбора на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе), открепляются менее чем за 12 часов от начала инкубации со стимулирующим средством. В некоторых вариантах осуществления, большинство из множества клеток-мишеней (например, Т-клеток), иммобилизованных посредством

средства для отбора на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе), открепляются менее чем за 5 часов от начала инкубации со стимулирующим средством. В некоторых вариантах осуществления, большинство из множества клеток-мишеней (например, Т-клеток), иммобилизованных посредством средства для отбора на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе), открепляются менее чем за 4 часа от начала инкубации со стимулирующим средством. В некоторых вариантах осуществления, большинство из множества клеток-мишеней (например, Т-клеток), иммобилизованных посредством средства для отбора на хроматографическом матриксе (например, стационарной фазе), открепляются менее чем за 2 часа от начала инкубации со стимулирующим средством.

[0239] В некоторых вариантах осуществления, спонтанно открепившиеся клетки элюируют и/или собирают под действием силы тяжести из хроматографической колонки. В некоторых вариантах осуществления, спонтанно открепившиеся клетки элюируют из хроматографической колонки с использованием стадии промывки. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одну стадию промывки осуществляют через, приблизительно через или по меньшей мере через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов после начала инкубации со стимулирующим средством или стимулирующий реагент, содержащим стимулирующие средства. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько стадий промывки осуществляют через, приблизительно через или по меньшей мере через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, или 24 часов после начала инкубации со стимулирующим средством или стимулирующим реагентом, содержащим стимулирующие средства. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько стадий промывки осуществляют в пределах приблизительно 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 7-24, 8-24, 9-24, 10-24, 11-24, 12-24, 13-24, 14-24, 15-24, 16-24, 17-24, 18-24, 19-24, 20-24, 21-24, 22-24, 23-24, 2-23, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 или 2-3 часов после начала инкубации со стимулирующими средствами или стимулирующим реагентом, включающим стимулирующие средства.

[0240] В некоторых вариантах осуществления, стадию элюции и/или сбора после стадий отбора и стимуляции на колонке проводят в пределах точно или приблизительно 2 суток после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу), например, как описано в разделе I-A. В некоторых вариантах осуществления, стадию элюции и/или сбора после стадий отбора и стимуляции на колонке проводят в пределах точно или приблизительно 1-2 суток после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу), например, как описано в разделе I-A. В некоторых вариантах осуществления, стадию элюции и/или сбора после стадий отбора и стимуляции на колонке проводят в пределах точно или приблизительно 1 суток после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу), например, как описано в разделе I-A. В некоторых вариантах осуществления, стадию элюции и/или сбора после стадий отбора и стимуляции на колонке

проводят менее чем 1 сутки после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу), например, как описано в разделе I-A. В некоторых вариантах осуществления, стадию элюции и/или сбора после стадий отбора и стимуляции на колонке проводят в пределах точно или приблизительно 48, 36, 24, 12, 6, 4 или 2 часов, включительно, после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу), например, как описано в разделе I-A. В некоторых вариантах осуществления, стадию сбора или элюции после стадий отбора и стимуляции на колонке проводят в пределах точно или приблизительно 2-48, 2-36, 2-24, 2-12, 2-6, 2-4, 4-48, 4-36, 4-24, 4-12, 4-6, 6-48, 6-36, 6-24, 6-12, 12-48, 12-36, 12-24, 24-48, 24-36 или 36-48 часов после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, длительность процесса, включая стадии от отбора и стимуляции на колонке до элюции или сбора, составляет менее чем 48, 36, 24, 12, 6, 4 или 2 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность процесса, включая стадии от отбора и стимуляции на колонке до элюции или сбора, составляет менее чем 36 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность процесса, включая стадии от отбора и стимуляции на колонке до элюции или сбора, составляет менее чем 24 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность процесса, включая стадии от отбора и стимуляции на колонке до элюции или сбора, составляет менее чем 12 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность процесса, включая стадии от отбора и стимуляции на колонке до элюции или сбора, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 7 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность процесса, включая стадии от отбора и стимуляции на колонке до элюции или сбора, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 6,5 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность процесса, включая стадии от отбора и стимуляции на колонке до элюции или сбора, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 6 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность процесса, включая стадии от отбора и стимуляции на колонке до элюции или сбора, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 5,5 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность процесса, включая стадии от отбора и стимуляции на колонке до элюции или сбора, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 5 часов. В некоторых вариантах осуществления, длительность процесса, включая стадии от отбора и стимуляции на колонке до элюции или сбора, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 4,5 часа. В некоторых вариантах осуществления, длительность процесса, включая стадии от отбора и стимуляции на колонке до элюции или сбора, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 4 часов.

[0241] В некоторых вариантах осуществления, среда для промывки представляет собой культуральную среду. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, элюированные клетки можно переводить непосредственно на нижестоящую переработку (например, стадии последующего отбора, стадии стимуляции, стадии инкубации,

генетическую инженерию). В некоторых вариантах осуществления, среда для промывки содержит бессывороточную базовую среду, содержащую глутамин и рекомбинантный IL-2, IL-15, и IL-7. В некоторых вариантах осуществления, среда для промывки содержит бессывороточную базовую среду, содержащую глутамин и не содержащую один или несколько рекомбинантных IL-2, IL-15 и IL-7. В некоторых вариантах осуществления, среда для промывки содержит бессывороточную базовую среду, не содержащую глутамин и один или несколько рекомбинантных IL-2, IL-15, и IL-7.

[0242] В некоторых вариантах осуществления, элюат содержит стимулирующий реагент (например, олигомерный стимулирующий реагент). В некоторых вариантах осуществления, собранные клетки все еще связаны со стимулирующими средствами (например, стимулирующими средствами, связанными с олигомерным стимулирующим реагентом). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие средства, содержащиеся в элюате, связаны с элюированной клеткой и стимулирующим реагентом (например, олигомерным стимулирующим реагентом). Таким образом, собранные и/или элюированные клетки все еще можно считать находящимися в стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления, открепленные и элюированные клетки находятся в стимулирующих условиях (например, все еще подвергаются стимуляции). В некоторых вариантах осуществления, элюированные клетки могут продолжать находиться в стимулирующих условиях, например, как описано в разделе I-C.

[0243] В некоторых вариантах осуществления, колонка и контейнеры для сбора соединены в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления, закрытая система является стерильной. В некоторых вариантах осуществления, стадии отбора, стимуляции и элюции осуществляют посредством автоматизированной системы с минимумом или отсутствием ручного, например, осуществляемого человеком, действия или влияния.

[0244] В некоторых вариантах осуществления, представленные способы включают генетическую модификацию клетки (например, выходной композиции отобранных и стимулированных клеток), например, введение гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок. Такие рекомбинантные белки могут включать рекомбинантные рецепторы, такие как любые, описанные в разделе IV. Введение полинуклеотидов, например, гетерологичных или рекомбинантных полинуклеотидов, кодирующих рекомбинантный белок, в клетку, можно проводить с использованием любого количества известных векторов. Такие векторы включают вирусные, включая лентивирусные и гаммаретровирусные, системы. Иллюстративные способы включают способы переноса гетерологичных полинуклеотидов, кодирующих рецепторы, включая вирусную, например, ретровирусную или лентивирусную трансдукцию. В некоторых вариантах осуществления, популяцию стимулированных клеток (например, выходную композицию отобранных и стимулированных клеток) генетически модифицируют, например, для введения гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, таким

образом, получая популяцию трансформированных клеток (также обозначенную в настоящем описании как трансформированная популяция клеток).

[0245] В конкретных вариантах осуществления, клетки (например, Т-клетки, CD3+, CD4+, CD8+ Т-клетки) генетически модифицируют, трансформируют или трансдуцируют после того, как клетки подвергли стимуляции на колонке, например, посредством любых способов, представленных в настоящем описании, например, в разделе I-C. В конкретных вариантах осуществления, одну или несколько стимулированных популяций ранее подвергали криозащите и хранению, и размораживают перед генетической модификацией, трансформацией, трансфекцией или трансдукцией клеток.

[0246] В конкретных вариантах осуществления, клетки (например, Т-клетки, CD3+, CD4+, CD8+ Т-клетки) генетически модифицируют, трансформируют или трансдуцируют после того, как клетки стимулировали или подвергали стимуляции, или культивировали в стимулирующих условиях (например, при стимуляции на колонке). В конкретных вариантах осуществления, клетки генетически модифицируют, трансформируют или трансдуцируют через, через приблизительно или в пределах 72 часов, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов, 12 часов, 5 часов, 4 часов или 2 часов, включительно, после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, клетки генетически модифицируют через точно или приблизительно 2, 3, 4, 5 или 6 часов от начала стимуляции на колонке. В некоторых вариантах осуществления, клетки генетически модифицируют через точно или приблизительно 4-5 часов от начала стимуляции на колонке. В некоторых вариантах осуществления, клетки все еще находятся в стимулирующих условиях в ходе генетической инженерии. В конкретных вариантах осуществления, клетки генетически модифицируют, трансформируют или трансдуцируют через между точно или приблизительно 2 часа и 6 часов или 6 часов и 12 часов, после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, клетки генетически модифицируют, трансформируют или трансдуцируют через между точно или приблизительно 12 часов и 48 часов, 16 часов и 36 часов, или 18 часов и 30 часов после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, клетки генетически модифицируют, трансформируют или трансдуцируют через между точно или приблизительно 18 часов и 30 часов после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, клетки генетически модифицируют, трансформируют или трансдуцируют через точно или приблизительно 22 часа или 24 часа после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, клетки генетически модифицируют, трансформируют или трансдуцируют через точно или приблизительно 6 часов или 12 часов после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, клетки генетически модифицируют, трансформируют или трансдуцируют через точно или приблизительно 4 часа или 5 часов после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, клетки генетически модифицируют, трансформируют или трансдуцируют через точно или приблизительно 2 часа или 3 часа после начала стимуляции.

[0247] В конкретных вариантах осуществления, способы генетической инженерии осуществляют посредством приведения в контакт или введения в одну или несколько клеток из популяции (например, выходной композиции отобранных и стимулированных клеток) молекулы нуклеиновой кислоты или полинуклеотида, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотида является гетерологичной для клеток. В конкретных вариантах осуществления, гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты или гетерологичный полинуклеотид не являются природными для клеток. В конкретных вариантах осуществления, гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты или гетерологичный полинуклеотид кодирует белок, например, рекомбинантный белок, естественным образом не экспрессируемый клеткой. В конкретных вариантах осуществления, гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотид представляет собой или содержит последовательность нуклеиновой кислоты, не обнаруженную в клетке до контакта или введения.

[0248] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, выходную композицию, модифицируют, например, трансдуцируют в присутствии усилителя трансдукции. Иллюстративные усилители трансдукции включают, но без ограничения, поликатионы, фибронектин, или происходящие из фибронектина фрагменты или варианты, и RetroNectin. В конкретных вариантах осуществления, клетки модифицируют в присутствии поликатионов, фибронектина или происходящих из фибронектина фрагментов или вариантов, и/или RetroNectin. В конкретных вариантах осуществления, клетки модифицируют в присутствии поликатиона, такого как полибрен, DEAE-декстран, сульфат протамина, поли-L-лизин или катионная липосома. В конкретных вариантах осуществления, клетки модифицируют в присутствии сульфата протамина.

[0249] В некоторых вариантах осуществления, генетическую модификацию, например, трансдукцию, проводят в бессывороточных средах, например, как описано в настоящем описании в разделе III или in PCT/US2018/064627. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой культуральную среду определенного или точно определенного состава. В конкретных вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой контролируемую культуральную среду, которая была переработана, например, фильтрована, для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит белки. В конкретных вариантах осуществления, бессывороточная среда может содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы прикрепления. В некоторых вариантах осуществления, среда содержит глутамин.

[0250] В конкретных вариантах осуществления, клетки модифицируют в присутствии одного или нескольких цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют

собой рекомбинантные человеческие цитокины. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов связывают и/или являются способными связывать рецепторы, которые экспрессируются Т-клетками и/или являются эндогенными для Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают член семейства цитокинов с 4-альфа-спиральным пучком. В некоторых вариантах осуществления, члены семейства цитокинов с 4-альфа-спиральным пучком включают, но без ограничения, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин 12 (IL-12), интерлейкин 15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-15. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-7. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный IL-2.

[0251] В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, стимулированные клетки, модифицируют в стимулирующих условиях в присутствии IL-2, IL-7 и/или IL-15. В конкретных вариантах осуществления, IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются рекомбинантными. В конкретных вариантах осуществления, IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются человеческими. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают человеческие рекомбинантные IL-2, IL-7, и/или IL-15. В конкретных вариантах осуществления, клетки модифицируют, например, трансдуцируют в стимулирующих условиях в присутствии рекомбинантных IL-2, IL-7, и IL-15.

[0252] В некоторых вариантах осуществления, клетки генетически модифицируют, трансформируют или трансдуцируют в присутствии сред, одинаковых или сходных с присутствовавшими во время стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, клетки генетически модифицируют, трансформируют или трансдуцируют в средах, имеющих такие же цитокины, как среды, присутствовавшие во время стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, клетки генетически модифицируют, трансформируют или трансдуцируют, в средах, имеющих такие же цитокины в таких же концентрациях, как среды, присутствовавшие во время стимуляции.

1. Трансдукция

[0253] В некоторых вариантах осуществления, генетическая модификация клеток (например, выходной композиции) представляет собой или включает введение полинуклеотида, например, гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, в клетки посредством трансдукции. В некоторых вариантах осуществления, клетки трансдуцируют или подвергают трансдукции вирусным вектором. В конкретных вариантах осуществления, клетки трансдуцируют или подвергают трансдукции вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления, вирус представляет собой ретровирусный вектор, такой как аммаретровирусный вектор или лентивирусный вектор.

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.

[0254] В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию проводят посредством приведения одной или нескольких клеток из популяции (например, выходной 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 патентной публикации номер WO2016/073602. Иллюстративные камеры для центрифугирования включают камеры, производимые и продаваемые в Biosafe SA, включая камеры для использования с системой Serax® и Serax® 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.: US 2008/0171951, и опубликованной международной патентной заявке, публикация по. 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.

[0255] В некоторых вариантах осуществления, представленные способы используют в сочетании с трансдукцией вирусного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор в, в приблизительно или в менее чем 300×10^6 клеток, например, жизнеспособных Т-клеток из стимулированной популяции клеток. В конкретных вариантах осуществления, точно или приблизительно 100×10^6 клеток, например, жизнеспособных Т-клеток из стимулированной популяции клеток трансдуцируют или подвергают трансдукции. В некоторых вариантах осуществления, 1×10^6 клеток на мл, например, жизнеспособных Т-клеток из стимулированной популяции клеток трансдуцируют или подвергают трансдукции. В некоторых вариантах осуществления, доза вирусного вектора составляет точно или приблизительно 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, или 1 мкл на 1×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, доза вирусного вектора составляет между точно или приблизительно 6-4 мкл на 1×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, доза вирусного вектора составляет точно или приблизительно 5 мкл на 1×10^6 клеток.

[0256] В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию проводят в бессывороточных средах. В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию проводят в присутствии IL-2, IL-7 и IL-15. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор для трансдукции замораживают и размораживают перед использованием, и

размороженный вирусный вектор разводят бессывороточными средами. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточные среды для разведения вирусного вектора и для трансдукции являются такими, как описано в настоящем описании в разделе III или в PCT/US2018/064627.

[0257] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду (например, базовую среду для размножения Т-клеток OpTmizer™ (ThermoFisher), дополненную одной или несколькими добавками. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько добавок является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду, дополненную одним или несколькими дополнительными компонентами для поддержания, размножения, и/или активации клетки (например, Т-клетки), такими, как представленные посредством дополнительной добавки (например, добавки для размножения Т-клеток OpTmizer™ (ThermoFisher)). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит заменяющую сыворотку добавку, например, заменитель сыворотки для иммуноцитов, например, ThermoFisher, #A2596101, заменитель сыворотки для иммуноцитов CTS™, или заменитель сыворотки для иммуноцитов, описанный в Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит свободную форму аминокислоты, такую как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит дипептидную форму L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамин), такую как дипептид в Glutamax™ (ThermoFisher). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный человеческий IL-2, рекомбинантный человеческий IL-7 и/или рекомбинантный человеческий IL-15.

[0258] В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, клетки из стимулированной популяции клеток (например, выходной композиции) содержат по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% клеток, представляющих собой CD4+ Т-клетки или CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию, включая инкубацию после трансдукции, проводят в течение между 24 и 48 часов, между 36 и 12 часов, между 18 и 30 часов, или в течение приблизительно 24 часов. В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию, включая инкубацию после трансдукции, проводят в течение точно или приблизительно 72 часов±6 часов. В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию проводят в течение точно или приблизительно 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 часов. В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию проводят в течение точно или приблизительно 0,5, 1, 1,5 или 2 часов. В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию проводят в течение точно или приблизительно 0,5-1,5 часов. В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию проводят в течение точно или приблизительно 1 час.

[0259] В конкретных вариантах осуществления, стадию трансдукции начинают в пределах двух суток, в пределах 36 часов, в пределах 30 часов, в пределах 24 часов, в

пределах 12 часов, в пределах 6 часов, в пределах 5 часов, в пределах 4 часов или в пределах 2 часов от начала или инициации инкубации, например, инкубации в стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления, стадию трансдукции начинают в пределах 4-5 часов от начала или инициации инкубации, например, инкубации в стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления, стадию трансдукции начинают через приблизительно 20 часов от начала или инициации инкубации, например, инкубации в стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления, стадию трансдукции начинают через точно или приблизительно 4-5 часов от начала или инициации инкубации, например, инкубации в стимулирующих условиях.

[0260] 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 нескольких различных других стадий переработки, осуществляемых в системе, например, одной или нескольких стадий переработки, которые можно проводить с или в сочетании с системой камеры для центрифугирования, как описано в настоящем описании/или в Международной патентной 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, Патент США No. 6733433 и US 2008/0171951.

[0261] В некоторых вариантах осуществления, система содержит серии контейнеров, например, пакетов, трубки, электронные схемы, зажимы, коннекторы и камеру для центрифугирования. В некоторых вариантах осуществления, контейнеры, такие как пакеты, включают один или несколько контейнеров, таких как пакеты, содержащие клетки, подлежащие трансдукции, и частицы вирусного вектора, в одном и том же контейнере или в отдельных контейнерах, таких как один и тот же пакет или отдельные пакеты. В некоторых вариантах осуществления, система дополнительно включает один или несколько контейнеров, таких как пакеты, содержащие среду, такую как разбавитель и/или раствор для промывки, которые входят в состав камеры и/или других компонентов для разведения, ресуспендирования и/или промывки компонентов и/или популяций в ходе способов. Контейнеры можно присоединять в одном или нескольких положениях в системе, например, в положении, соответствующем линии входа, линии разведения, линии промывки, линии отходов и/или линии выхода.

[0262] В некоторых вариантах осуществления, камера взаимодействует с центрифугой, способной осуществлять вращение камеры, например, вокруг ее оси вращения. Вращение может происходить до, во время и/или после инкубации в сочетании с трансдукцией клеток, и/или на одной или нескольких из других стадий переработки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, одну или несколько из различных стадий переработки проводят при вращении, например, с определенным ускорением.

Камера, как правило, является способной к вертикальному или в основном вертикальному вращению, таким образом, что камера находится вертикально во время центрифугирования, и боковая стенка и ось являются вертикальными или в основном вертикальными, где торцевая стенка(стенки) являются горизонтальными или в основном горизонтальными.

[0263] В некоторых вариантах осуществления, популяцию, содержащую клетки, и популяцию, содержащую частицы вирусного вектора, и необязательно, воздух, можно объединять или смешивать до подачи популяций в полость. В некоторых вариантах осуществления, популяцию, содержащую клетки, и популяцию, содержащую частицы вирусного вектора, и необязательно, воздух, подают отдельно, и объединяют и смешивают в полости. В некоторых вариантах осуществления, популяцию, содержащую клетки, популяцию, содержащую частицы вирусного вектора, и необязательно, воздух, можно поставлять во внутреннюю полость в любом порядке. В любом из таких некоторых вариантов осуществления, популяция, содержащая клетки и частицы вирусного вектора, представляет собой входную популяцию после объединения или смешивания вместе, независимо от того, проводят ли такое объединение или смешивание внутри или вне камеры для центрифугирования, и/или от того, поставляют ли клетки и частицы вирусного вектора в камеру для центрифугирования вместе или отдельно, например, одновременно или последовательно.

[0264] В некоторых вариантах осуществления, забор некоторого объема газа, такого как воздух, происходит до инкубации клеток и частиц вирусного вектора, такой как вращение, в способе трансдукции. В некоторых вариантах осуществления, забор некоторого объема газа, такого как воздух, происходит во время инкубации клеток и частиц вирусного вектора, такой как вращение, в способе трансдукции.

[0265] В некоторых вариантах осуществления, жидкий объем клеток или частиц вирусного вектора, составляющих популяцию для трансдукции, и необязательно, объем воздуха, может представлять собой predetermined объем. Этот объем может представлять собой объем, запрограммированный и/или контролируемый посредством схемы, ассоциированной с системой.

[0266] В некоторых вариантах осуществления, забор популяции для трансдукции, и необязательно, газа, такого как воздух, контролируют вручную, полуавтоматически и/или автоматически, до забора желательного или predetermined объема во внутреннюю полость камеры. В некоторых вариантах осуществления, сенсор, ассоциированный с системой, может детектировать протекание жидкости и/или газа внутрь и наружу камеры для центрифугирования, например, посредством их цвета, скорости потока и/или плотности, и может связываться с ассоциированной схемой для остановки/или продолжения забора, по необходимости, до достижения забора такого желательного или predetermined объема. В некоторых аспектах, сенсор, запрограммированный или способный детектировать только жидкость в системе, но не газ (например, воздух), может быть изготовлен с возможностью пропускания газа, такого как воздух, в систему без

остановки забора. В некоторых таких вариантах осуществления, непрозрачный фрагмент трубки можно помещать в линию около сенсора, когда забор газа, такого как воздух, является желательным. В некоторых вариантах осуществления, забор газа, такого как воздух, можно контролировать вручную.

[0267] В аспектах представленных способов, внутреннюю полость камеры для центрифугирования подвергают вращению с высокой скоростью. В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляют до, одновременно, последовательно или попеременно с забором жидкой входной популяции, и необязательно, воздуха. В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляют после забора жидкой входной популяции, и необязательно, воздуха. В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляют посредством центрифугирования камеры для центрифугирования с относительным центробежным ускорением на внутренней поверхности боковой стенки внутренней полости и/или на поверхности слоя клеток точно или приблизительно или по меньшей мере точно или приблизительно 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 600 g, 700 g, 800 g, 1000 g, 1100 g, 1500, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2500 g, 3000 g, 3200 g, 3500 g или 4000 g. В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляют посредством центрифугирования с ускорением, составляющим более чем или приблизительно 1100 g, например, более чем или приблизительно 1200 g, более чем или приблизительно 1400 g, более чем или приблизительно 1600 g, более чем или приблизительно 1800 g, более чем или приблизительно 2000 g, более чем или приблизительно 2400 g, более чем или приблизительно 2800 g, более чем или приблизительно 3000 g или более чем или приблизительно 3200 g. В конкретных вариантах осуществления, вращение посредством центрифугирования осуществляют с ускорением между 600 g и 800 g. В конкретных вариантах осуществления, вращение посредством центрифугирования осуществляют с ускорением точно или приблизительно 693 g. В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляют посредством центрифугирования с ускорением, составляющим точно или приблизительно 1600 g.

[0268] В некоторых вариантах осуществления, газ, такой как воздух, в полости камеры выгоняют из камеры. В некоторых вариантах осуществления, газ, такой как воздух, выгоняют в контейнер, функционально связанный, в качестве части закрытой системы, с камерой для центрифугирования. В некоторых вариантах осуществления, контейнер представляет собой свободный или пустой контейнер. В некоторых вариантах осуществления, воздух, такой как газ, в полости камеры выгоняют через фильтр, функционально связанный с внутренней полостью камеры через стерильную линию трубок. В некоторых вариантах осуществления, воздух выгоняют с использованием ручных, полуавтоматических или автоматических способов. В некоторых вариантах осуществления, воздух выгоняют из камеры до, одновременно, попеременно или последовательно с вытеснением выходной популяции, содержащей инкубированные клетки и частицы вирусного вектора, такие как клетки, в которых начата трансдукция, или клетки, трансдуцированные вирусным вектором, из полости камеры.

[0269] В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию и/или другие инкубацию проводят в качестве или в качестве части непрерывного или полунепрерывного процесса. В некоторых вариантах осуществления, непрерывный процесс включает непрерывный забор клеток и частиц вирусного вектора, например, композиции для трансдукции (либо в форме одной предсуществующей композиции, либо посредством непрерывной подачи в один и тот же сосуд, например, полость, и таким образом, смешивания, ее частей), и/или непрерывное вытеснение или удаление жидкости, и необязательно выдувание газа (например, воздуха), из сосуда, в ходе по меньшей мере части инкубации, например, во время центрифугирования. В некоторых вариантах осуществления, непрерывный забор и непрерывное вытеснение проводят, по меньшей мере частично, одновременно. В некоторых вариантах осуществления, непрерывный забор проводят в ходе части инкубации, например, в ходе части центрифугирования, и непрерывное вытеснение проводят в ходе отдельной части инкубации. Эти два можно чередовать. Таким образом, непрерывный забор и вытеснение, во время проведения инкубации, может позволять переработку, например, трансдукцию, большего общего объема образца.

[0270] В некоторых вариантах осуществления, инкубация является частью непрерывного процесса, включающего, в ходе по меньшей мере части инкубации, осуществление непрерывного забора указанной композиции для трансдукции в полость во время вращения камеры и в ходе части инкубации, осуществление непрерывного вытеснения жидкости и, необязательно выдувание газа (например, воздух), из полости через по меньшей мере одно отверстие во время вращения камеры.

[0271] В некоторых вариантах осуществления, полунепрерывную инкубацию проводят посредством чередования между осуществлением забора композиции в полость, инкубации, вытеснения жидкости из полости и, необязательно выдувания газа (например, воздуха) из полости, например, в выходной контейнер, и затем забор последующей (например, второй, третьей и т.д.) композиции, содержащей больше клеток и других реагентов для переработки, например, частиц вирусного вектора, и повторения процесса. Например, в некоторых вариантах осуществления, инкубация является частью полунепрерывного процесса, включающего, до инкубации, осуществление забора композиции для трансдукции в полость через указанное по меньшей мере одно отверстие, и после инкубации, осуществление вытеснения жидкости из полости; осуществление забора другой композиции для трансдукции, содержащей клетки и частицы вирусного вектора, в указанную внутреннюю полость; и инкубацию другой композиции для трансдукции в указанной внутренней полости в условиях, посредством которых указанные клетки в указанной другой композиции для трансдукции трансдуцируют или подвергают трансдукции указанным вектор. Процесс можно продолжать чередующимся образом в течение некоторого количества дополнительных циклов. В этом отношении, полунепрерывные или непрерывные способы могут позволять продукцию даже большего объема и/или количества клеток.

[0272] В некоторых вариантах осуществления, часть инкубации для трансдукции проводят в камере для центрифугирования, которую проводят в условиях, включающих вращение или центрифугирование.

[0273] В конкретных вариантах осуществления, трансдукция клеток вирусным вектором представляет собой или включает спинокуляцию, например, центрифугирование смеси, содержащей клетки и вирусные частицы. В некоторых вариантах осуществления, композицию, содержащую клетки и вирусные частицы, можно вращать, как правило, при относительно низких ускорении/или скорости, такой как скорость, ниже, чем используют для осаждения клеток, например, от точно или приблизительно 600 об./мин до 1700 об./мин (например, точно или приблизительно или по меньшей мере 600 об./мин, 1000 об./мин, или 1500 об./мин или 1700 об./мин). В некоторых вариантах осуществления, вращение проводят с ускорением, например, относительным центробежным ускорением, от точно или приблизительно 100 g до 4000 g (например, точно или приблизительно или по меньшей мере точно или приблизительно 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 600 g, 700 g, 800 g, 900 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g или 3500 g), как измерено, например, на внутренней или внешней стенке камеры или полости.

[0274] В некоторых вариантах осуществления, клетки спинокулируют вирусным вектором с ускорением, например, относительным центробежным ускорением, между точно или приблизительно 100 g и 4000 g, 200 g и 1000 g, 500 g и 1200 g, 1000 g и 2000 g, 600 g и 800 g, 1200 g и 1800 g или 1500 g и 1800 g. В конкретных вариантах осуществления, клетки спинокулируют частицей вирусного вектора при, по меньшей мере при или приблизительно при 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 600 g, 700 g, 800 g, 900 g, 1000 g, 1200 g, 1500 g, 1600 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g, 3200 g или 3500 g. В некоторых вариантах осуществления, клетки трансдуцируют или подвергают трансдукции вирусным вектором с ускорением точно или приблизительно 692 g. В конкретных вариантах осуществления, клетки трансдуцируют или подвергают трансдукции вирусным вектором с ускорением точно или приблизительно 1600 g. В некоторых вариантах осуществления, ускорение представляет собой ускорение на внутренней поверхности боковой стенки внутренней полости и/или на поверхности слоя клеток.

[0275] В конкретных вариантах осуществления, клетки спинокулируют, например, композицию клеток, содержащую клетки и вирусный вектор, вращают, в течение более чем или приблизительно 5 минут, например, более чем или приблизительно 10 минут, более чем или приблизительно 15 минут, более чем или приблизительно 20 минут, более чем или приблизительно 30 минут, более чем или приблизительно 45 минут, более чем или приблизительно 60 минут, более чем или приблизительно 90 минут или более чем или приблизительно 120 минут; или между точно или приблизительно 5 минут и 120 минут, 30 минут и 90 минут, 15 минут и 60 минут, 15 минут и 45 минут, 30 минут и 60 минут или 45 минут и 60 минут, включая каждое. В некоторых вариантах осуществления, клетки спинокулируют вирусным вектором в течение точно или приблизительно 30 минут. В

конкретных вариантах осуществления, клетки спинокулируют вирусным вектором в течение точно или приблизительно 60 минут.

[0276] В некоторых вариантах осуществления, способ трансдукции включает спинокуляцию, например, вращение или центрифугирование композиции для трансдукции, и необязательно, воздуха, в камере для центрифугирования в течение более чем или приблизительно 5 минут, например, более чем или приблизительно 10 минут, более чем или приблизительно 15 минут, более чем или приблизительно 20 минут, более чем или приблизительно 30 минут, более чем или приблизительно 45 минут, более чем или приблизительно 60 минут, более чем или приблизительно 90 минут или более чем или приблизительно 120 минут. В некоторых вариантах осуществления, композицию для трансдукции, и необязательно, воздух, вращают или центрифугируют в камере для центрифугирования в течение более чем 5 минут, но в течение не более чем 60 минут, не более чем 45 минут, не более чем 30 минут или не более чем 15 минут. В конкретных вариантах осуществления, трансдукция включает вращение или центрифугирование в течение точно или приблизительно 60 минут.

[0277] В некоторых вариантах осуществления, способ трансдукции включает вращение или центрифугирование композиции для трансдукции, и необязательно, воздуха, в камере для центрифугирования в течение между точно или приблизительно 10 минут и 60 минут, 15 минут и 60 минут, 15 минут и 45 минут, 30 минут и 60 минут или 45 минут и 60 минут, включая каждое, и с ускорением на внутренней поверхности боковой стенки внутренней полости и/или на поверхности слоя клеток точно или приблизительно 1000 g, 1100 g, 1200 g, 1400 g, 1500 g, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2400 g, 2800 g, 3200 g или 3600 g. В конкретных вариантах осуществления, способ трансдукции включает вращение или центрифугирование композиции для трансдукции, например, клеток и частиц вирусного вектора, при точно или приблизительно 1600 g в течение точно или приблизительно 60 минут.

[0278] В некоторых вариантах осуществления, способ трансдукции не включает вращение или центрифугирование.

2. Частицы вирусного вектора

[0279] 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), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гаммаретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 November 29(11): 550-557.

[0280] В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор имеет последовательность длинного концевой повтора (LTR), например, из ретровирусного вектора, происходящую из вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мыши (MESV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV), вируса, образующего очаги в селезенке (SFFV), или аденоассоциированного вируса (AAV). Большинство ретровирусных векторов происходят из мышинных 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.

[0281] Геном вирусного вектора, как правило, конструируют в форме плазмиды, которую можно трансфицировать в упаковывающую или продуцирующую линию клеток. В любом из таких примеров, последовательности трансгена, кодирующие рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, вставлены или локализованы в области вирусного вектора, например, как правило, в не являющейся необходимой области вирусного генома. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота вставлена в вирусный геном вместо определенных вирусных последовательностей для получения вируса, который является дефектным по репликации.

[0282] 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.

[0283] 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.

[0284] В некоторых вариантах осуществления, геном вирусного вектора вводят в упаковывающую линию клеток, содержащую все компоненты, необходимые для упаковки вирусной геномной РНК, транскрибированной с генома вирусного вектора, в вирусные частицы. Альтернативно, геном вирусного вектора может содержать один или несколько генов, кодирующих вирусные компоненты, в дополнение к одной или нескольким последовательностям, например, представляющих интерес рекомбинантных нуклеиновых кислот. 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.

[0285] В некоторых вариантах осуществления, упаковывающую линию клеток трансфицируют одним или несколькими плазмидными векторами, содержащими компоненты, необходимые для получения частиц. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающую линию клеток трансфицируют плазмидой, содержащей геном вирусного вектора, включая LTR, цис-действующую упаковывающую последовательность и представляющую интерес последовательность, т.е., нуклеиновую кислоту, кодирующую рецептор антигена, такой как CAR; и одной или несколькими плазмидами-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.

[0286] 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.

[0287] 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).

[0288] В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая линия клеток стабильно экспрессирует вирусный белок(белки). Например, в некоторых аспектах, можно конструировать упаковывающую линию клеток, содержащую gag, pol, rev и/или другие структурные гены, но без LTR и упаковывающих компонентов. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающую линию клеток можно временно трансфицировать молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими один или несколько вирусных белков, вместе с геномом вирусного вектора, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок, и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей гликопротеин оболочки.

[0289] 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.

[0290] 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.

[0291] В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, можно продуцировать в упаковывающей линии клеток, такой как иллюстративная линия клеток НЕК 293Т, посредством введения плазмид, чтобы позволить образование лентивирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая клетка трансфицирована полинуклеотидом и/или содержит полинуклеотид, кодирующий gag и pol, и полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, такой рецептор антигена, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая линия клеток, необязательно и/или дополнительно,

трансфицирована полинуклеотидом и/или содержит полинуклеотид, кодирующий белок rev. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая линия клеток, необязательно и/или дополнительно, трансфицирована полинуклеотидом и/или содержит полинуклеотид, кодирующий неприродный гликопротеин оболочки, такой как VSV-G. В некоторых таких вариантах осуществления, приблизительно через двое суток после трансфекции клеток, например, клеток НЕК 293Т, супернатант клеток содержит рекомбинантные лентивирусные векторы, которые можно выделять и титровать.

[0292] 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.

3. Инкубация клеток

[0293] В конкретных вариантах осуществления, генетическая инженерия, например, посредством трансформации (например, трансдукции) клеток (например, выходной композиции) вирусным вектором, дополнительно включает одну или несколько стадий инкубации клеток после введения в клетки или контакта клеток с вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, клетки из трансформированной популяции клеток, инкубируют после процессов генетической модификации, трансформации, трансдукции или трансфекции клеток для введения вирусного вектора в клетки. В конкретных вариантах осуществления, инкубация приводит к получению популяции инкубированных клеток (также обозначенной в настоящем описании как инкубированная популяция клеток).

[0294] В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют после проведения введения гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, например, частиц вирусного вектора, без дополнительной переработки клеток. В конкретных вариантах осуществления, до инкубации, клетки промывают, например, для удаления или по существу удаления экзогенных или оставшихся полинуклеотидов, кодирующих гетерологичный или рекомбинантный полинуклеотид, например, частиц вирусного вектора, таких как частицы, оставшиеся в средах после способа генетической инженерии, после спинокуляции.

[0295] В некоторых таких вариантах осуществления, дополнительную инкубацию осуществляют в условиях, приводящих к интеграции вирусного вектора в геном хозяина для одной или нескольких клеток. В пределах компетенции специалиста в данной области находится оценка или определение того, привела ли инкубация к интеграции частиц вирусного вектора в геном хозяина, и таким образом, эмпирическое определение условий для дополнительной инкубации. В некоторых вариантах осуществления, интеграцию вирусного вектора в геном хозяина можно оценивать посредством измерения уровня экспрессии рекомбинантного белка, такого как гетерологичный белок, кодируемый

нуклеиновой кислотой, содержащейся в геноме частицы вирусного вектора, после инкубации. Можно использовать ряд хорошо известных способов оценки уровня экспрессии рекомбинантных молекул, таких как рекомбинантных молекул способами на основе аффинности, например, способами на основе иммуноаффинности, например, в контексте белков поверхности клеток, например, посредством проточной цитометрии. В некоторых примерах, экспрессию измеряют посредством детекции маркера трансдукции и/или репортерной конструкции. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота кодирующая укороченный поверхностный белок включают в вектор и используют в качестве маркера его экспрессии и/или обогащения.

[0296] В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в статических условиях, таких как условия, не включающие центрифугирование, встряхивание, вращение, движение или перфузию, например, непрерывную или полунепрерывную перфузию сред. В некоторых вариантах осуществления, либо до, либо вскоре после, например, в пределах 5, 15 или 30 минут, начала инкубации, клетки переносят (например, переносят в стерильных условиях) в контейнер, такой как пакет или флакон, и помещают в инкубатор.

[0297] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть инкубации проводят во внутренней полости камеры для центрифугирования, например, как описано в Международной патентной публикации номер WO2016/073602.

[0298] В некоторых вариантах осуществления, клетки, в которые введен полинуклеотид, кодирующий гетерологичный или рекомбинантный полипептид, например, вирусные векторы, переносят в контейнер для инкубации. В некоторых вариантах осуществления, контейнер представляет собой флакон. В конкретных вариантах осуществления, контейнер представляет собой пакет. В некоторых вариантах осуществления, клетки, и необязательно, гетерологичный или рекомбинантный полипептид, переносят в контейнер в закрытых или стерильных условиях. В некоторых вариантах осуществления, контейнер, например, флакон или пакет, затем помещают в инкубатор на всю или часть инкубации. В конкретных вариантах осуществления, инкубатор устанавливают на, приблизительно на или по меньшей мере на 16°C, 24°C или 35°C. В некоторых вариантах осуществления, инкубатор устанавливают на 37°C, приблизительно на 37°C или на 37°C ±2°C, ±1°C, ±0,5°C или ±0,1°C.

[0299] В некоторых аспектах, условия инкубации могут включать одно или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, средств, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие средства, разработанные для активации клеток.

[0300] В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в бессывороточных средах. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой культуральную среду определенного или точно определенного

состава. В конкретных вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой контролируемую культуральную среду, которая была переработана, например, фильтрована, для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит белки. В конкретных вариантах осуществления, бессывороточная среда может содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы прикрепления.

[0301] В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в присутствии одного или нескольких цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные человеческие цитокины. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов связывают и/или являются способными связывать рецепторы, которые экспрессируются Т-клетками и/или являются эндогенными для Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают член семейства цитокинов с 4-альфа-спиральным пучком. В некоторых вариантах осуществления, члены семейства цитокинов с 4-альфа-спиральным пучком включают, но без ограничения, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин 12 (IL-12), интерлейкин 15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-15. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-7. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный IL-2.

[0302] В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в присутствии IL-2, IL-7 и/или IL-15. В конкретных вариантах осуществления, IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются рекомбинантными. В конкретных вариантах осуществления, IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются человеческими. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают человеческие рекомбинантные IL-2, IL-7 и/или IL-15. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в присутствии рекомбинантных IL-2, IL-7 и IL-15.

[0303] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют с цитокином, например, рекомбинантным человеческим цитокином, в концентрации между 1 МЕ/мл и 1000 МЕ/мл, между 10 МЕ/мл и 50 МЕ/мл, между 50 МЕ/мл и 100 МЕ/мл, между 100 МЕ/мл и 200 МЕ/мл, между 100 МЕ/мл и 500 МЕ/мл, между 250 МЕ/мл и 500 МЕ/мл, или между 500 МЕ/мл и 1000 МЕ/мл.

[0304] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют с IL-2, например, человеческим рекомбинантным IL-2, в концентрации между 1 МЕ/мл и 500 МЕ/мл, между 10 МЕ/мл и 250 МЕ/мл, между 50 МЕ/мл и 200 МЕ/мл, между 50 МЕ/мл и 150 МЕ/мл, между 75

МЕ/мл и 125 МЕ/мл, между 100 МЕ/мл и 200 МЕ/мл, или между 10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют с рекомбинантным IL-2 в концентрации точно или приблизительно 50 МЕ/мл, 60 МЕ/мл, 70 МЕ/мл, 80 МЕ/мл, 90 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 110 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 130 МЕ/мл, 140 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 160 МЕ/мл, 170 МЕ/мл, 180 МЕ/мл, 190 МЕ/мл или 100 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют в присутствии точно или приблизительно 100 МЕ/мл рекомбинантного IL-2, например, человеческого рекомбинантного IL-2.

[0305] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют с рекомбинантным IL-7, например, человеческим рекомбинантным IL-7, в концентрации между 100 МЕ/мл и 2000 МЕ/мл, между 500 МЕ/мл и 1000 МЕ/мл, между 100 МЕ/мл и 500 МЕ/мл, между 500 МЕ/мл и 750 МЕ/мл, между 750 МЕ/мл и 1000 МЕ/мл, или между 550 МЕ/мл и 650 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют с IL-7 в концентрации точно или приблизительно 50 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 250 МЕ/мл, 300 МЕ/мл, 350 МЕ/мл, 400 МЕ/мл, 450 МЕ/мл, 500 МЕ/мл, 550 МЕ/мл, 600 МЕ/мл, 650 МЕ/мл, 700 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 800 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 750 МЕ/мл или 1000 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют в присутствии точно или приблизительно 600 МЕ/мл IL-7.

[0306] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют с рекомбинантным IL-15, например, человеческим рекомбинантным IL-15, в концентрации между 1 МЕ/мл и 500 МЕ/мл, между 10 МЕ/мл и 250 МЕ/мл, между 50 МЕ/мл и 200 МЕ/мл, между 50 МЕ/мл и 150 МЕ/мл, между 75 МЕ/мл и 125 МЕ/мл, между 100 МЕ/мл и 200 МЕ/мл, или между 10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют с рекомбинантным IL-15 в концентрации точно или приблизительно 50 МЕ/мл, 60 МЕ/мл, 70 МЕ/мл, 80 МЕ/мл, 90 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 110 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 130 МЕ/мл, 140 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 160 МЕ/мл, 170 МЕ/мл, 180 МЕ/мл, 190 МЕ/мл или 200 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют в присутствии точно или приблизительно 100 МЕ/мл рекомбинантного IL-15, например, человеческого рекомбинантного IL-15.

[0307] В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют в присутствии IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых вариантах осуществления, IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются рекомбинантными. В конкретных вариантах осуществления, IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются человеческими. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают человеческие рекомбинантные IL-2, IL-7 и/или IL-15. В конкретных

вариантах осуществления, клетки инкубируют в присутствии рекомбинантных ИЛ-2, ИЛ-7 и ИЛ-15.

[0308] В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации, например, из не включающего размножения способа, проводят в средах, содержащих базовую среду (например, базовую среду CTS OpTmizer (Thermofisher)), глутамин и один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15. В некоторых вариантах осуществления, среды могут содержать один или несколько дополнительных компонентов, таких, как указано в разделе III. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов могут включать дипептидную форму L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов предоставляют посредством дополнительной добавки, например, добавки OpTmizer® (Thermofisher). В некоторых вариантах осуществления, среда представляет собой бессывороточную среду и не содержит никакого компонента сыворотки. В некоторых аспектах, среды могут содержать один или несколько заменяющих сыворотку белков, таких как один или несколько из альбумина, инсулина или трансферрина (например, заменитель сыворотки для иммунцитов CTS™). Иллюстративные бессывороточные среды или их компоненты описаны в разделе III.

[0309] В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в присутствии сред, одинаковых или сходных с присутствовавшими во время стимуляции клеток, такой, как проводят в связи с методами или способами стимуляции (например, стимуляции на колонке), описанными выше. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в средах, имеющих такие же цитокины, как среды, присутствовавшие во время стимуляции клеток, такой, как проводят в связи с методами или способами стимуляции, описанными выше. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в средах, имеющих такие же цитокины в таких же концентрациях, как среды, присутствовавшие во время стимуляции клеток, такой, как проводят в связи с методами или способами стимуляции, описанными выше.

[0310] В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в отсутствие рекомбинантных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в отсутствие одного или нескольких цитокинов, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в отсутствие всех цитокинов, описанных в настоящем описании.

[0311] В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации проводят в базовой среде, такой как базовая среда без одного или нескольких рекомбинантных цитокинов или без какого-либо рекомбинантного цитокина. В некоторых вариантах осуществления, среда не содержит одного или нескольких рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный человеческий ИЛ-2, рекомбинантный человеческий ИЛ-7 и/или рекомбинантный человеческий ИЛ-15. В некоторых аспектах, инкубацию проводят без каких-либо рекомбинантных цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, базовая

среда является дополненной дополнительными добавками. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не является дополненной какими-либо дополнительными добавками. Добавки для культуральных сред могут включать, но без ограничения, пищевые добавки, сахара, например, глюкозу, аминокислоты, витамины, или добавки, такие как АТФ и NADH. Другие добавки также можно добавлять, но, как правило, конкретные добавки и количества являются такими, что инкубация сред с клетками способствует поддержанию клеток, но минимизирует, ограничивает и/или не индуцирует метаболическую активность клеток во время инкубации.

[0312] В конкретных вариантах осуществления, среда представляет собой базовую среду, которая не содержит одного или нескольких рекомбинантных цитокинов и которая не содержит компонент сыворотки, т.е., представляет собой бессывороточную среду, но может содержать один или несколько дополнительных компонентов, таких как описано в разделе III. В. В конкретных вариантах осуществления, использование таких бессывороточных сред во всей или части инкубации, например, из не включающего размножения способа, например, в соответствии с разделом I-E-3, предоставляет бедные среды, обеспечивающие поддержание клеток, но не включающие конкретные факторы, которые могут активировать клетки или делать клетки метаболически активными, таким образом, подкармливая клетки в состоянии, которое является или вероятно, является состоянием отдыха или покоя. В некоторых аспектах, инкубация (например, в соответствии с разделом I-E-3) в присутствии таких бессывороточных сред позволяет клеткам восстанавливаться после стимуляции и генетической инженерии (например, трансдукции). В некоторых аспектах, инкубация (например, в соответствии с разделом I-E-3) в присутствии таких бессывороточных сред приводит к получению выходной композиции (например, терапевтической композиции клеток), содержащей клетки, которые являются менее чувствительными к повреждению или потере жизнеспособности, например, во время или после производственного процесса, и когда собранные/составленные клетки криоконсервируют и затем размораживают непосредственно перед использованием. В некоторых вариантах осуществления, клетки в выходной композиции (например, терапевтической композиции клеток) при размораживании имеют более низкие уровни каспазы или другого маркера апоптоза, чем клетки, которые были инкубированы в сходных средах, но содержащих один или несколько рекомбинантных цитокинов, сыворотку или другие факторы, которые могут делать клетки более метаболически активными, при криоконсервации выходной композиции (например, терапевтической композиции клеток).

[0313] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит смесь неорганических солей, сахаров, аминокислот и, необязательно, витаминов, органических кислот и/или буферов, или других хорошо известных питательных веществ для культуральных сред. В дополнение к питательным веществам, среда также способствует поддержанию рН и осмоляльности. В некоторых аспектах, реагенты из базовой среды поддерживают рост, пролиферацию и/или размножение клеток. Широкое множество

коммерчески доступных базовых сред хорошо известны специалисту в данной области, и включают среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), среду Roswell Park Memorial Institute (RPMI), среду Дульбекко в модификации Искова и среду Хэма. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда представляет собой среду Дульбекко в модификации Искова, RPMI-1640 или α -MEM.

[0314] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда представляет собой сбалансированный солевой раствор (например, PBS, DPBS, HBSS, EBSS). В некоторых вариантах осуществления, базовая среда выбрана из среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальной поддерживающей среды (MEM), базовой среды Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальной поддерживающей среды Глазго (GMEM), минимальной поддерживающей среды альфа (альфа MEM), среды Дульбекко в модификации Искова и M199. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда представляет собой комплексную среду (например, RPMI-1640, IMDM). В некоторых вариантах осуществления, базовая среда представляет собой базовую среду для размножения Т-клеток OpTmizer™ CTS™ (ThermoFisher).

[0315] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит белка. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит человеческого белка (например, человеческого сывороточного белка). В некоторых вариантах осуществления, базовая среда является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит сыворотки, полученной от человека. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит рекомбинантного белка. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит человеческого белка и рекомбинантного белка. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит одного или нескольких, или всех цитокинов, как описано в настоящем описании.

[0316] В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации, например, для не включающего размножения способа, проводят в базовой среде без каких-либо дополнительных добавок или рекомбинантных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда представляет собой базовую среду CTS OpTmizer (Thermofisher) без каких-либо дополнительных добавок или рекомбинантных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации, например, для не включающего размножения способа, проводят в средах, содержащих базовую среду и глутамин, например, базовую среду CTS OpTmizer (Thermofisher) с глутамином.

[0317] В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации, например, из не включающего размножения способа, проводят в средах, содержащих базовую среду (например, базовую среду CTS OpTmizer (Thermofisher)) без одного или нескольких рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный человеческий IL-2, рекомбинантный человеческий IL-7 и/или рекомбинантный человеческий IL-15. В некоторых вариантах осуществления, среда является дополненной одним или несколькими дополнительными не относящимися к сыворотке компонентами, такими как

указано в разделе III.B. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько добавок является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит свободную форму аминокислоты, такую как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда не содержит заменяющую сыворотку добавку. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда не содержит дипептидную форму L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда не содержит какого-либо рекомбинантного цитокина. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду, дополненную добавкой для Т-клеток и свободной формой L-глутамин, и не содержит какого-либо заменителя сыворотки для иммуноцитов, какой-либо дипептидной формы L-глутамин или какого-либо рекомбинантного цитокина. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду (например, дополненную базовую среду для размножения Т-клеток OpTmizer™), L-глутамин и одну или несколько дополнительных компонентов, таких как предоставленные посредством добавки (например, добавки для размножения Т-клеток OpTmizer™).

[0318] В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в бессывороточной среде в концентрации точно или приблизительно $0,25 \times 10^6$ клеток/мл, $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, $0,75 \times 10^6$ клеток/мл, $1,0 \times 10^6$ клеток/мл, $1,25 \times 10^6$ клеток/мл, $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, $1,75 \times 10^6$ клеток/мл, или $2,0 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в бессывороточной среде в концентрации между точно или приблизительно $0,25 \times 10^6$ клеток/мл и $1,0 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в бессывороточной среде в концентрации между точно или приблизительно $0,25 \times 10^6$ клеток/мл и $0,75 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в бессывороточной среде в концентрации между точно или приблизительно $0,5 \times 10^6$ клеток/мл и $0,75 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в бессывороточной среде в концентрации между точно или приблизительно $0,25 \times 10^6$ клеток/мл и $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в бессывороточной среде в концентрации точно или приблизительно $0,75 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в бессывороточной среде в концентрации точно или приблизительно $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение точно или приблизительно между 18 часов и 30 часов. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение точно или приблизительно 24 часов или в течение приблизительно одних суток.

[0319] В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в отсутствие цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в отсутствие какого-либо рекомбинантного цитокина. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в отсутствие одного или нескольких рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный IL-2, IL-7 и/или IL-15.

[0320] В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации, например, для не включающего размножения способа, проводят в средах, содержащих базовую среду, глутамин и один или несколько рекомбинантных цитокинов, например, базовую среду CTS OpTmizer (Thermofisher) с глутамином и рекомбинантный IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации, например, для не включающего размножения способа, проводят в средах, содержащих базовую среду, глутамин, один или несколько рекомбинантных цитокинов и добавку для Т-клеток, например, базовую среду CTS OpTmizer (Thermofisher) с глутамином, рекомбинантный IL-2, IL-7 и/или IL-15, и добавку OpTmizer® (Thermofisher). В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации, например, для не включающего размножения способа, проводят в средах, содержащих базовую среду, глутамин, один или несколько рекомбинантных цитокинов, добавку для Т-клеток, и один или несколько заменяющих сыворотку белков, например, базовую среду CTS OpTmizer (Thermofisher) с глутамином, рекомбинантный IL-2, IL-7 и/или IL-15, добавку OpTmizer® (Thermofisher), и заменяющие сыворотку белки, такие как один или несколько из альбумина, инсулина или трансферрина.

[0321] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда дополнительно содержит глутамин, такой как L-глутамин. В некоторых аспектах, глутамин представляет собой свободную форму глутамина, такую как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, концентрация глутамина, такого как L-глутамин, в базовой среде составляет приблизительно или менее чем приблизительно 0,5 мМ-1 мМ, 0,5 мМ-1,5 мМ, 0,5 мМ-2 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-4 мМ, 0,5 мМ-4,5 мМ, 0,5 мМ-5 мМ, 1 мМ-1,5 мМ, 1 мМ-2 мМ, 1 мМ-2,5 мМ, 1 мМ-3 мМ, 1 мМ-3,5 мМ, 1 мМ-4 мМ, 1 мМ-4,5 мМ, 1 мМ-5 мМ, 1,5 мМ-2 мМ, 1,5 мМ-2,5 мМ, 1,5 мМ-3 мМ, 1,5 мМ-3,5 мМ, 1,5 мМ-4 мМ, 1,5 мМ-4,5 мМ, 1,5 мМ-5 мМ, 2 мМ-2,5 мМ, 2 мМ-3 мМ, 2 мМ-3,5 мМ, 2 мМ-4 мМ, 2 мМ-4,5 мМ, 2 мМ-5 мМ, 2,5 мМ-3 мМ, 2,5 мМ-3,5 мМ, 2,5 мМ-4 мМ, 2,5 мМ-4,5 мМ, 2,5 мМ-5 мМ, 3 мМ-3,5 мМ, 3 мМ-4 мМ, 3 мМ-4,5 мМ, 3 мМ-5 мМ, 3,5 мМ-4 мМ, 3,5 мМ-4,5 мМ, 3,5 мМ-5 мМ, 4 мМ-4,5 мМ, 4 мМ-5 мМ, или 4,5 мМ-5 мМ, включая каждую. В некоторых вариантах осуществления, концентрация глутамина, такого как L-глутамин, в базовой среде составляет по меньшей мере приблизительно 0,5 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация глутамина, такого как L-глутамин, в базовой среде составляет самое большее приблизительно 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ, 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация глутамина, такого как L-глутамин, в базовой среде составляет приблизительно 2 мМ.

[0322] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда дополнительно может содержать белок или пептид. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок не имеет происхождения, отличного от млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок является человеческим или происходящим из человеческого. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей

мере один белок является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок включает альбумин, трансферрин, инсулин, фибронектин, апротинин или фетуин. В некоторых вариантах осуществления, белок содержит один или несколько из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно, один или несколько из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

[0323] В некоторых вариантах осуществления, белок представляет собой альбумин или заменитель альбумина. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой полученный от человека альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой природный человеческий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный человеческий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин из не относящегося к человеку источника. Заменители альбумина могут представлять собой любой источник белка или полипептида. Примеры таких образцов белка или полипептида включают, но без ограничения, экстракт гипофиза быка, гидролизат растений (например, гидролизат риса), эмбриональный телячий альбумин (фетуин), яичный альбумин, человеческий сывороточный альбумин (HSA), или другие происходящие из животных альбумины, куриный экстракт, бычий эмбриональный экстракт, AlbuMAX® I и AlbuMAX® II. В некоторых вариантах осуществления, белок или пептид содержит трансферрин. В некоторых вариантах осуществления, белок или пептид содержит фибронектин. В некоторых вариантах осуществления, белок или пептид содержит апротинин. В некоторых вариантах осуществления, белок содержит фетуин.

[0324] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных белков является частью заменяющей сыворотку добавки, которую добавляют в базовую среду. Примеры заменяющих сыворотку добавок включают, например, заменитель сыворотки для иммуноцитов (ThermoFisher, #A2598101) или добавки, описанные в Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31.

[0325] В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют после введения полинуклеотида, кодирующего гетерологичный или рекомбинантный белок, например, вирусного вектора, в течение, в течение приблизительно или в течение по меньшей мере 18 часов, 24 часов, 30 часов, 36 часов, 40 часов, 48 часов, 54 часов, 60 часов, 72 часов, 84 часов, 96 часов или более чем 96 часов. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют после введения полинуклеотида, кодирующего гетерологичный или рекомбинантный белок, например, вирусного вектора, в течение, в течение приблизительно или в течение по меньшей мере одних суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, или более чем 4 суток. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение количества времени между 30 минут и 2 часов, между 1 час и 8 часов, между 6 часов и 12 часов, между 12 часов и 18 часов, между 16 часов и 24 часов, между 18 часов и 30 часов, между 24 часов и 48 часов, между 24 часов и 72 часов, между 42 часов и 54

часов, между 60 часов и 120 часов, между 96 часов и 120 часов, между 90 часов и между 1 суток и 7 суток, между 3 суток и 8 суток, между 1 сутки и 3 суток, между 4 суток и 6 суток, или между 4 суток и 5 суток до генетической модификации. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение точно или приблизительно между 18 часов и 30 часов. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение точно или приблизительно 24 часов или в течение точно или приблизительно одних суток.

[0326] В конкретных вариантах осуществления, общая продолжительность инкубации составляет, составляет приблизительно или составляет по меньшей мере 12 часов, 18 часов, 24 часов, 30 часов, 36 часов, 42 часов, 48 часов, 54 часов, 60 часов, 72 часов, 84 часов, 96 часов, 108 часов или 120 часов. В конкретных вариантах осуществления, общая продолжительность инкубации составляет, составляет приблизительно или составляет по меньшей мере одни сутки, 2 суток, 3 суток, 4 суток или 5 суток. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию завершают через, приблизительно через или в пределах 120 часов, 108 часов, 96 часов, 84 часов, 72 часов, 60 часов, 54 часов, 48 часов, 42 часов, 36 часов, 30 часов, 24 часов, 18 часов, или 12 часов. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию завершают через, приблизительно через или в пределах одних суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток или 5 суток. В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность инкубации составляет между точно или приблизительно 12 часов и 120 часов, 18 часов и 96 часов, 24 часа и 72 часа, или 24 часа и 48 часов, включительно. В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность инкубации составляет между или приблизительно между 1 час и 48 часов, 4 часов и 36 часов, 8 часов и 30 часов или 12 часов и 24 часов, включительно. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение точно или приблизительно 24 часов, 48 часов, или 72 часов, или в течение точно или приблизительно 1 суток, 2 суток или 3 суток, соответственно. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение 24 часов \pm 6 часов, 48 часов \pm 6 часов или 72 часов \pm 6 часов. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение точно или приблизительно 72 часов или в течение точно или приблизительно 3 суток. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение периода времени, достаточного, чтобы позволить интеграцию полинуклеотида, кодирующего гетерологичный или рекомбинантный белок, в геном клеток.

[0327] В конкретных вариантах осуществления, инкубацию начинают через, приблизительно через или по меньшей мере через 12 часов, 18 часов, 24 часов, 30 часов, 36 часов, 42 часов, 48 часов после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию начинают через, приблизительно через или по меньшей мере через 0,5 суток, одни сутки, 1,5 суток или 2 суток после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию начинают через, через приблизительно или в пределах 120 часов, 108 часов, 96 часов, 84 часов, 72 часов, 60 часов, 54 часов, 48 часов, 42 часов, 36 часов, 30 часов, 24 часов, 18 часов или 12 часов после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию начинают через, через приблизительно

или в пределах 11 часов, 10 часов, 9 часов, 8 часов, 7 часов, 6 часов, 5 часов, или 4 часов после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию начинают через, через приблизительно или в пределах 5 суток, 4 суток, 3 суток, 2 суток, одних суток или 0,5 суток после начала стимуляции.

[0328] В некоторых вариантах осуществления, инкубацию завершают между точно или приблизительно 24 часа и 120 часов, 36 часов и 108 часов, 48 часов и 96 часов, или 48 часов и 72 часов, включительно, после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию завершают через, приблизительно через или в пределах 120 часов, 108 часов, 96 часов, 72 часов, 48 часов или 36 часов после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию завершают через, приблизительно через или в пределах 5 суток, 4,5 суток, 4 суток, 3 суток, 2 суток или 1,5 суток после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию завершают через 24 часа \pm 6 часов, 48 часов \pm 6 часов, или 72 часа \pm 6 часов после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию завершают через или приблизительно через 72 часа или через или приблизительно через 3 суток.

[0329] В некоторых из любых из вариантов осуществления выше, модифицированные клетки не инкубируют в условиях культивирования для размножения популяции клеток (например, количества жизнеспособных Т-клеток). В некоторых любых из вышеуказанных вариантов осуществления, клетки не инкубируют в условиях культивирования, которые увеличивают количество жизнеспособных клеток во время инкубации или культивирования. Например, в некоторых аспектах, клетки не инкубируют в условиях (например, в условиях культивирования), которые увеличивают общее количество жизнеспособных клеток в конце инкубации, по сравнению с общим количеством жизнеспособных клеток в начале инкубации. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в условиях, которые могут приводить к размножению, но условия инкубации не осуществляют для целей размножения популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки которые были инкубированы в условиях, которые не стимулируют или не облегчают размножение и пролиферацию, могут быть обозначены как не подвергнутые размножению или подвергнутые минимальному размножению (см. раздел I-G).

[0330] В некоторых вариантах осуществления, трансдуцированные или модифицированные клетки инкубируют в условиях культивирования, которые стимулируют пролиферацию и/или размножение после стадии генетической модификации, например, введения рекомбинантного полипептида в клетки посредством трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления, клетки культивируют после того, как клетки трансдуцировали или трансфицировали рекомбинантным полинуклеотидом, например, полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, в результате культивирования получают одну или несколько культивированных композиций модифицированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, такие условия

культивирования могут быть разработаны для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживаемости клеток в популяции. В конкретных вариантах осуществления, условия культивирования могут включать одно или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, средств, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие средства, разработанные для стимуляции роста, деления и/или размножения клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые были инкубированы в условиях, стимулирующих пролиферацию и/или размножение, могут быть обозначены как подвергнутые размножению клетки (см. раздел I-G).

[0331] В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в условиях культивирования (например, культивируют) в концентрации точно или приблизительно $0,25 \times 10^6$ клеток/мл, $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, $0,75 \times 10^6$ клеток/мл, $1,0 \times 10^6$ клеток/мл, $1,25 \times 10^6$ клеток/мл, $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, $1,75 \times 10^6$ клеток/мл или $2,0 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в условиях культивирования в концентрации между точно или приблизительно $0,25 \times 10^6$ клеток/мл и $1,0 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в условиях культивирования в концентрации между точно или приблизительно $0,25 \times 10^6$ клеток/мл и $0,75 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в условиях культивирования в концентрации между точно или приблизительно $0,5 \times 10^6$ клеток/мл и $0,75 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в условиях культивирования в концентрации между точно или приблизительно $0,25 \times 10^6$ клеток/мл и $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в условиях культивирования в концентрации точно или приблизительно $0,75 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в условиях культивирования в концентрации точно или приблизительно $0,5 \times 10^6$ клеток/мл.

[0332] В некоторых вариантах осуществления, модифицированные клетки культивируют (например, подвергают культивированию) в контейнере, который можно заполнять, например, через загрузочное отверстие, культуральными средами и/или клетками, для культивирования добавленных клеток. Клетки могут происходить из любого источника клеток, для которого культивирование клеток является желательным, например, для размножения и/или пролиферации клеток.

[0333] В некоторых аспектах, культуральная среда представляет собой адаптированную культуральную среду, которая поддерживает рост, размножение или пролиферацию клеток, таких как Т-клетки. В некоторых аспектах, среда может представлять собой жидкость, содержащую смесь солей, аминокислот, витаминов, сахаров или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, культуральная среда дополнительно содержит одно или несколько стимулирующих условий или средств, например, для стимуляции размножения или пролиферации клеток

во время инкубации. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующее условие представляет собой или включает один или несколько цитокинов, например, выбранных из IL-2, IL-7 или IL-15. В некоторых вариантах осуществления, цитокин представляет собой рекомбинантный цитокин. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные человеческие цитокины. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов связывают и/или являются способными связывать рецепторы, которые экспрессируются Т-клетками и/или являются эндогенными для Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают член семейства цитокинов с 4-альфа-спиральным пучком. В некоторых вариантах осуществления, члены семейства цитокинов с 4-альфа-спиральным пучком включают, но без ограничения, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин 12 (IL-12), интерлейкин 15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-15. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-7. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный IL-2.

[0334] В некоторых вариантах осуществления, концентрация одного или нескольких цитокинов в культуральных средах в ходе культивирования, независимо, составляет от точно или приблизительно 1 МЕ/мл до 1500 МЕ/мл, например, от точно или приблизительно 1 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, 2 МЕ/мл-50 МЕ/мл, 5 МЕ/мл-10 МЕ/мл, 10 МЕ/мл-500 МЕ/мл, 50 МЕ/мл-250 МЕ/мл или 100 МЕ/мл-200 МЕ/мл, 50 МЕ/мл-1500 МЕ/мл, 100 МЕ/мл-1000 МЕ/мл или 200 МЕ/мл-600 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления, концентрация одного или нескольких цитокинов, независимо, составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1 МЕ/мл, 5 МЕ/мл, 10 МЕ/мл, 50 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 500 МЕ/мл, 1000 МЕ/мл или 1500 МЕ/мл.

[0335] В некоторых вариантах осуществления, композицию модифицированных клеток культивируют при температуре 25-38°C, например, 30-37°C, например, точно или приблизительно 37 °C±2 °C. В некоторых вариантах осуществления, условия культивирования осуществляют в течение периода времени, пока культура, например, культивирование или размножение, не приведет к получению желательной или пороговой плотности, концентрации, количества или дозы клеток. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение периода времени, пока культура, например, культивирование или размножение, не приведет к получению желательной или пороговой плотности, концентрации, количества или дозы жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение более чем или более чем приблизительно, или проводят в течение приблизительно или точно 24 часов, 48 часов, 72 часов, 96 часов, 5 суток, 6 суток, 7 суток, 8 суток, 9 суток или более.

[0336] В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют или культивируют в условиях для поддержания целевого количества диоксида углерода в культуре клеток. В некоторых аспектах, это обеспечивает оптимальное культивирование, размножение и пролиферацию клеток в ходе роста. В некоторых аспектах, количество диоксида углерода (CO₂) составляет между 10% и 0% (об./об.) указанного газа, например, между 8% и 2% (об./об.) указанного газа, например, количество точно или приблизительно 5% (об./об.) CO₂.

[0337] В конкретных вариантах осуществления, культивирование проводят в закрытой системе. В конкретных вариантах осуществления, культивирование проводят в закрытой системе в стерильных условиях. В некоторых вариантах осуществления композицию модифицированных клеток удаляют из закрытой системы и помещают в биореактор и/или соединяют с биореактором для культивирования. Примеры пригодных биореакторов для культивирования включают, но без ограничения, GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20 | 50, системы биореакторов Finesse SmartRocker и системы биореакторов Pall XRS. В некоторых вариантах осуществления, биореактор используют для перфузии и/или перемешивания клеток в ходе по меньшей мере части стадии культивирования.

[0338] В некоторых вариантах осуществления, клетки, культивированные во время заключения в биореактор, соединения с биореактором и/или под контролем биореактора, подвергаются размножению в ходе культивирования более быстро, чем клетки, культивируемые в отсутствие биореактора, например, клетки, культивируемые в статических условиях, например, в отсутствие перемешивания, вращения, движения и/или перфузии. В некоторых вариантах осуществления, для клеток, культивированных во время заключения в биореактор, соединения с биореактором и/или под контролем биореактора, достигают или добиваются порогового размножения, количества клеток и/или плотности в пределах 14 суток, 10 суток, 9 суток, 8 суток, 7 суток, 6 суток, 5 суток, 4 суток, 3 суток, 2 суток, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов или 12 часов. В некоторых вариантах осуществления, для клеток, культивированных во время заключения в биореактор, соединения с биореактором и/или под контролем биореактора, достигают или добиваются порогового размножения, количества клеток и/или плотности по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз больше, чем для клеток, культивированных в иллюстративном и/или альтернативном способе, где клетки не культивируют во время заключения в биореактор, соединения с биореактором и/или под контролем биореактора.

[0339] В некоторых вариантах осуществления, смешивание представляет собой или включает качание и/или движение. 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 и 16°. В других вариантах осуществления, угол качания составляет между 7 и 16°. В других вариантах осуществления, угол качания составляет между 8 и 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.

[0340] В некоторых вариантах осуществления, композицию, содержащую клетки, такие как модифицированные клетки, например, модифицированные Т-клетки, модифицированные CD3+ Т-клетки, модифицированные CD4+ Т-клетки или модифицированные CD8+ Т-клетки, культивируют в присутствии поверхностно-активного вещества. В конкретных вариантах осуществления, культивирование клеток из композиции уменьшает уровень напряжения сдвига, которое может возникать в ходе культивирования, например, из-за перемешивания, вращения, движения и/или перфузии. В конкретных вариантах осуществления, композицию клеток, таких как модифицированные клетки, например, модифицированные Т-клетки, модифицированные CD3+ Т-клетки, модифицированные CD4+ Т-клетки или модифицированные CD8+ Т-клетки, культивируют с поверхностно-активным веществом, и по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,9% Т-клеток выживают, например, являются жизнеспособными и/или не подвергаются некрозу, программируемой гибели клеток или апоптозу, в течение или по меньшей мере в течение 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 7 суток или более чем 7 суток после завершения культивирования. В конкретных вариантах осуществления, композицию клеток, таких как модифицированные Т-клетки, например, модифицированные CD3+ Т-клетки, модифицированные CD4+ Т-клетки или модифицированные CD8+ Т-клетки, культивируют в присутствии

поверхностно-активного вещества, и менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 25%, менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10%, менее чем 5%, менее чем 1%, менее чем 0,1% или менее чем 0,01% клеток подвергаются гибели клеток, например, программируемой гибели клеток, апоптозу и/или некрозу, например, из-за сдвига или индуцированного сдвигом стресса.

[0341] В конкретных вариантах осуществления, композицию клеток, таких как модифицированные Т-клетки, например, модифицированные CD4+ Т-клетки или модифицированные CD8+ Т-клетки, культивируют в присутствии между 0,1 мкл/мл и 10,0 мкл/мл, между 0,2 мкл/мл и 2,5 мкл/мл, между 0,5 мкл/мл и 5 мкл/мл, между 1 мкл/мл и 3 мкл/мл, или между 2 мкл/мл и 4 мкл/мл поверхностно-активного вещества. В некоторых вариантах осуществления, композицию клеток, таких как модифицированные Т-клетки, например, модифицированные CD4+ Т-клетки или модифицированные CD8+ Т-клетки, культивируют в присутствии точно, приблизительно или по меньшей мере 0,1 мкл/мл, 0,2 мкл/мл, 0,4 мкл/мл, 0,6 мкл/мл, 0,8 мкл/мл, 1 мкл/мл, 1,5 мкл/мл, 2,0 мкл/мл, 2,5 мкл/мл, 5,0 мкл/мл, 10 мкл/мл, 25 мкл/мл, или 50 мкл/мл поверхностно-активного вещества. В конкретных вариантах осуществления, композицию клеток культивируют в присутствии точно или приблизительно 2 мкл/мл поверхностно-активного вещества.

[0342] В некоторых вариантах осуществления, поверхностно-активное вещество представляет собой или включает средство, уменьшающее поверхностное натяжение жидкостей и/или твердых веществ. Например, поверхностно-активное вещество включает жирный спирт (например, стерильный спирт), октилфеноловый эфир полиоксиэтиленгликоля (например, Triton X-100) или алкиловый сложный эфир полиоксиэтиленгликольсорбитана (например, полисорбат 20, 40, 60). В конкретных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата 80 (PS80), полисорбата 20 (PS20), полочсамера 188 (P188). В иллюстративном варианте осуществления, концентрация поверхностно-активного вещества в химически определенных питательных средах составляет от приблизительно 0,0025% до приблизительно 0,25% (об./об.) PS80; от приблизительно 0,0025% до приблизительно 0,25% (об./об.) PS20; или от приблизительно 0,1% до приблизительно 5,0% (масс./об.) P188.

[0343] В некоторых вариантах осуществления, поверхностно-активное вещество представляет собой или включает анионное поверхностно-активное вещество, катионное поверхностно-активное вещество, цвиттер-ионное поверхностно-активное вещество или неионное поверхностно-активное вещество, добавленное к этому. Пригодные анионные поверхностно-активные вещества включают, но без ограничения, алкилсульфонаты, алкилфосфаты, алкилфосфонаты, лаурат калия, стеарат триэтаноламина, лаурилсульфат натрия, додецилсульфат натрия, алкилполиоксиэтиленсульфаты, альгинат натрия, сульфосукцинат диоктила натрия, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозин, фосфатидилинозитол, дифосфатидилглицерин, фосфатидилсерин, фосфатидную кислоту и их соли, карбоксиметилцеллюлозу натрия, холевую кислоту и другие желчные кислоты

(например, холевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, гликохолевую кислоту, таурохолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту) и их соли (например, дезоксихолат натрия).

[0344] В некоторых вариантах осуществления, пригодные неионные поверхностно-активные вещества включают: сложные эфиры глицерила, полиоксиэтиленовые эфиры жирных спиртов, полиоксиэтиленсорбитановые сложные эфиры жирных кислот (полисорбаты), полиоксиэтиленовые сложные эфиры жирных кислот, сложные эфир сорбитана, глицеринмоностеарат, полиэтиленгликоли, полипропиленгликоли, цетиловый спирт, цетостеариловый спирт, стеариловый спирт, арилалкилполиэфирные спирты, сополимеры полиоксиэтилена-полиоксипропилена (полоксамеры), полоксамины, метилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, некристаллическую целлюлозу, полисахариды, включая крахмал и производные крахмала, такие как гидроксипропилкрахмал (HES), поливиниловый спирт и поливинилпирролидон. В конкретных вариантах осуществления, неионное поверхностно-активное вещество представляет собой сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена, и предпочтительно, блок-сополимер пропиленгликоля и этиленгликоля. Такие полимеры продают под торговым наименованием ПОЛОКСАМЕР, также иногда обозначаемым как ПЛЮРОНИК® F68 или Kolliphor® P188. Среди полиоксиэтиленовых сложных эфиров жирных кислот включены эфиры, имеющие короткие алкильные цепи. Одним примером такого поверхностно-активного вещества является СОЛЮТОЛ® HS 15, полиэтилен-660-гидроксистеарат.

[0345] В некоторых вариантах осуществления, пригодные катионные поверхностно-активные вещества могут включать, но без ограничения, природные фосфолипиды, синтетические фосфолипиды, соединения четвертичного аммония, хлорид бензалкония, бромид цетилтриметиламмония, хитозаны, хлорид лаурилдиметилбензиламмония, гидрохлориды ацилкарнитина, бромид диметилдиоктадециламмония (DDAB), диолеилтриметиламмонийпропан (DOTAP), димиристоилтриметиламмонийпропан (DMTAP), диметиламиноэтанкарбамоилхолестерин (DC-Chol), 1,2-диацилглицеро-3-(О-алкил)фосфохолин, О-алкилфосфатидилхолин, галогениды алкилпиридиния или алкиламины с длинной цепью например, такие как *n*-октиламин и олеиламин.

[0346] Цвиттер-ионные поверхностно-активные вещества являются электрически нейтральными, но имеют местные положительные и отрицательные заряды в пределах одной и той же молекулы. Пригодные цвиттер-ионные поверхностно-активные вещества включают, но без ограничения, цвиттер-ионные фосфолипиды. Пригодные фосфолипиды включают фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, диацил-глицеро-фосфоэтанолламин (такой как димиристоил-глицеро-фосфоэтанолламин (DMPE), дипальмитоил-глицеро-фосфоэтанолламин (DPPE), дистеароил-глицеро-фосфоэтанолламин (DSPE) и диолеил-глицеро-фосфоэтанолламин (DOPE)). Смеси фосфолипидов, включающие анионные и цвиттер-ионные фосфолипиды, можно использовать по настоящему изобретению. Такие

смеси включают, но без ограничения лизофосфолипиды, фосфолипид яйца или сои, или любую их комбинацию. Фосфолипид, независимо от того, является ли он анионным, цвиттер-ионным или смесью фосфолипидов, может находиться в форме соли или являться обессоленным, гидрогенизированным или частично гидрогенизированным, или природным, полусинтетическим или синтетическим.

[0347] В конкретных вариантах осуществления, поверхностно-активное вещество представляет собой полуксамер, например, полуксамер 188. В некоторых вариантах осуществления, композицию клеток культивируют в присутствии между 0,1 мкл/мл и 10,0 мкл/мл, между 0,2 мкл/мл и 2,5 мкл/мл, между 0,5 мкл/мл и 5 мкл/мл, между 1 мкл/мл и 3 мкл/мл, или между 2 мкл/мл и 4 мкл/мл полуксамера. В некоторых вариантах осуществления, композицию клеток культивируют в присутствии точно, приблизительно или по меньшей мере 0,1 мкл/мл, 0,2 мкл/мл, 0,4 мкл/мл, 0,6 мкл/мл, 0,8 мкл/мл, 1 мкл/мл, 1,5 мкл/мл, 2,0 мкл/мл, 2,5 мкл/мл, 5,0 мкл/мл, 10 мкл/мл, 25 мкл/мл или 50 мкл/мл поверхностно-активного вещества. В конкретных вариантах осуществления, композицию клеток культивируют в присутствии точно или приблизительно 2 мкл/мл полуксамера.

[0348] В некоторых аспектах, популяции модифицированных Т-клеток (например, CD4, CD8) можно размножать отдельно или размножать совместно, пока они не достигнут порогового количества или плотности клеток. В конкретных вариантах осуществления, культивирование заканчивают, например, посредством сбора клеток, когда клетки достигают пороговых количества, концентрации и/или размножения. В конкретных вариантах осуществления, культивирование заканчивают, когда клетки достигают или достигают приблизительно, или по меньшей мере 1,5-кратного размножения, 2-кратного размножения, 2,5-кратного размножения, 3-кратного размножения, 3,5-кратного размножения, 4-кратного размножения, 4,5-кратного размножения, 5-кратного размножения, 6-кратного размножения, 7-кратного размножения, 8-кратного размножения, 9-кратного размножения, 10-кратного размножения или более чем 10-кратного размножения, например, по отношению и/или в связи с уровнем плотности клеток в начале или при инициации культивирования. В некоторых вариантах осуществления, порог размножения представляет собой 4-кратное размножение, например, по отношению и/или в связи с уровнем плотности клеток в начале или при инициации культивирования. В некоторых вариантах осуществления, культивирование заканчивают, например, посредством сбора клеток, когда клетки достигают порогового общего количества клеток, например, порогового количества клеток. В некоторых вариантах осуществления, культивирование заканчивают, когда клетки достигают порогового общего количества ядросодержащих клеток (TNC). В некоторых вариантах осуществления, культивирование заканчивают, когда клетки достигают порогового количества жизнеспособных клеток, например, порогового счета жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления, пороговое количество клеток составляет точно или приблизительно, или по меньшей мере 50×10^6 клеток, 100×10^6 клеток, 200×10^6 клеток, 300×10^6 клеток, 400×10^6 клеток, 600×10^6 клеток, 800×10^6 клеток, 1000×10^6

клеток, 1200×10^6 клеток, 1400×10^6 клеток, 1600×10^6 клеток, 1800×10^6 клеток, 2000×10^6 клеток, 2500×10^6 клеток, 3000×10^6 клеток, 4000×10^6 клеток, 5000×10^6 клеток, 10000×10^6 клеток, 12000×10^6 клеток, 15000×10^6 клеток или 20000×10^6 клеток, или любое из вышеуказанных пороговых количеств жизнеспособных клеток.

[0349] В конкретных вариантах осуществления, культивирование заканчивают, когда клетки достигают порогового количества клеток. В некоторых вариантах осуществления, культивирование заканчивают через, через приблизительно или в пределах 6 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов, 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, или 7 или более суток, после достижения порогового количества клеток. В конкретных вариантах осуществления, культивирование заканчивают через точно или приблизительно 1 сутки после достижения порогового количества клеток. В конкретных вариантах осуществления, пороговая плотность составляет, составляет приблизительно или составляет по меньшей мере $0,1 \times 10^6$ клеток/мл, $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, 1×10^6 клеток/мл, $1,2 \times 10^6$ клеток/мл, $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, $1,6 \times 10^6$ клеток/мл, $1,8 \times 10^6$ клеток/мл, $2,0 \times 10^6$ клеток/мл, $2,5 \times 10^6$ клеток/мл, $3,0 \times 10^6$ клеток/мл, $3,5 \times 10^6$ клеток/мл, $4,0 \times 10^6$ клеток/мл, $4,5 \times 10^6$ клеток/мл, $5,0 \times 10^6$ клеток/мл, 6×10^6 клеток/мл, 8×10^6 клеток/мл, или 10×10^6 клеток/мл, или любое из вышеуказанных пороговых количеств жизнеспособных клеток. В конкретных вариантах осуществления, культивирование заканчивают, когда клетки достигают пороговой плотности. В некоторых вариантах осуществления, культивирование заканчивают через, через приблизительно или в пределах 6 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов, 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, или 7 или более суток, после достижения пороговой плотности. В конкретных вариантах осуществления, культивирование заканчивают через точно или приблизительно 1 сутки после достижения пороговой плотности.

[0350] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть культивирования проводят в статических условиях. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть культивирования проводят с перфузией, чтобы выводить посредством перфузии использованную среду и вводить посредством перфузии свежую среду в ходе культивирования. В некоторых вариантах осуществления, способ включает стадию перфузии свежей культуральной среды в культуру клеток, например, через загрузочное отверстие. В некоторых вариантах осуществления, культуральная среда, добавленная в ходе перфузии, содержит одно или несколько стимулирующих средств, например, один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых вариантах осуществления, культуральная среда, добавленная в ходе перфузии, представляет собой такую же культуральную среду, как используемая в ходе статической инкубации.

[0351] В некоторых вариантах осуществления, после инкубации, контейнер, например, пакет, повторно присоединяют к системе для проведения одной или нескольких других стадий переработки для промышленного получения, получения или продукции 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.

а. Мониторирование клеток во время инкубации

[0352] В некоторых вариантах осуществления, клетки мониторируют во время стадии инкубации, например, при размножении (например, культивировании) или минимальном размножении/отсутствии размножения (например, инкубации). Мониторирование можно осуществлять, например, чтобы уточнить (например, измерить, количественно оценить) морфологию клетки, фенотип клетки, жизнеспособность клетки, гибель клетки, и/или концентрацию клеток (например, концентрацию жизнеспособных клеток). В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят вручную, например, посредством оператора-человека. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят посредством автоматизированной системы. Автоматизированная система может требовать минимального ввода вручную или не требовать ввода вручную для мониторинга культивированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят как вручную, так и посредством автоматизированной системы.

[0353] В конкретных вариантах осуществления, клетки мониторируют посредством автоматизированной системы, не требующей ввода вручную. В некоторых вариантах осуществления, автоматизированная система является совместимой с биореактором, например, биореактором, как описано в настоящем описании, или инкубатором, например, как описано в настоящем описании, так что клетки, подвергающиеся инкубации, например, подвергающиеся условиям размножения или минимального размножения, можно извлекать из биореактора или инкубатора, мониторировать и затем возвращать в биореактор или инкубатор. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг и инкубация происходят в закрытой петлевой конфигурации. В некоторых аспектах, в закрытой петлевой конфигурации, автоматизированная система и биореактор или инкубатор остаются стерильными. В некоторых вариантах осуществления, автоматизированная система является стерильной. В некоторых вариантах осуществления, автоматизированная система представляет собой встроенную систему.

[0354] В некоторых вариантах осуществления, автоматизированная система включает использование оптических способов (например, микроскопии) для детекции морфологии клетки, фенотипа клетки, жизнеспособности клетки, гибели клетки, и/или концентрации клеток (например, концентрации жизнеспособных клеток). Любые оптические способы, пригодные для определения, например, признаков, жизнеспособности и концентрации клеток, предусмотрены по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры оптических способов, которые можно использовать, включают светлопольную микроскопию, флуоресцентную микроскопию, дифференциальную интерференционную контрастную (DIC) микроскопию, фазово-контрастную микроскопию, цифровую голографическую микроскопию (DHM),

дифференциальную цифровую голографическую микроскопию (DDHM) или их комбинацию. Дифференциальную цифровую голографическую микроскопию, DDHM и дифференциальную ДНМ можно использовать по настоящему изобретению взаимозаменяемо. В конкретных вариантах осуществления, автоматизированная система включает дифференциальный цифровой голографический микроскоп. В конкретных вариантах осуществления, автоматизированная система включает дифференциальный цифровой голографический микроскоп, включающий осветительные средства (например, лазер, светодиод). Описание способа и использования DDHM можно обнаружить, например, в US 7362449; EP 1631788; US 9904248; и US 9684281, полное содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0355] DDHM позволяет не включающую метки, неdestructивную визуализацию клеток, приводящую к получению высококонтрастных голографических изображений. Изображения можно подвергать разделению объектов и дополнительному анализу для получения множества морфологических признаков, количественно описывающих визуализированные объекты (например, культивированные клетки, клеточный дебрис). Таким образом, различные признаки (например, морфологию клетки, фенотип, жизнеспособность клетки, концентрацию клеток) можно напрямую оценивать или рассчитывать по DDHM с использованием, например, стадий получения изображений, обработки изображений, сегментации изображений и выделения признаков. В некоторых вариантах осуществления, автоматизированная система включает цифровое записывающее устройство для записи голографических изображений. В некоторых вариантах осуществления, автоматизированная система включает компьютер, включающий алгоритмы для анализа голографических изображений. В некоторых вариантах осуществления, автоматизированная система включает монитор и/или компьютер для отображения результатов анализа голографического изображения. В некоторых вариантах осуществления, анализ является автоматизированным (т.е., с возможностью осуществления в отсутствие ввода пользователем). Пример пригодной автоматизированной системы для мониторинга клеток во время стадии культивирования включает, но без ограничения, Ovizio iLine F (Ovizio Imaging Systems NV/SA, Brussels, Belgium).

[0356] В конкретных вариантах осуществления, мониторинг проводят непрерывно на протяжении длительности инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят в реальном времени. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят в дискретных временных точках. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 15 минут на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 30 минут на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 45 минут на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления,

мониторирование проводят по меньшей мере каждый час на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 2 часа на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 4 часа на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 6 часов на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 8 часов на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 10 часов на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 12 часов на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 14 часов на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 16 часов на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 18 часов на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 20 часов на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере каждые 22 часа на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере один раз в сутки на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере один раз на каждые вторые сутки на протяжении длительности стадии инкубации. В некоторых вариантах осуществления, мониторинг проводят по меньшей мере один раз во время стадии инкубации.

[0357] В некоторых вариантах осуществления, признаки клеток, которые можно определять посредством мониторинга, включая мониторинг с использованием оптических способов, таких как DHM или DDHM, включают жизнеспособность клеток, концентрацию клеток, количество клеток и/или плотность клеток. В некоторых вариантах осуществления, жизнеспособность клеток характеризуют или определяют. В некоторых вариантах осуществления, концентрацию, плотность и/или количество клеток характеризуют или определяют. В некоторых вариантах осуществления, концентрацию жизнеспособных клеток, количество жизнеспособных клеток и/или плотность жизнеспособных клеток характеризуют или определяют.

[0358] В некоторых вариантах осуществления, например, когда клетки подвергают инкубации в условиях культивирования для размножения, клетки мониторируют посредством автоматизированной системы до достижения порога размножения, такого

как 1, 2, 3, 4, или более удвоений популяции. В некоторых вариантах осуществления, после достижения порога размножения, клетки собирают, например, посредством автоматических или ручных способов, например, посредством оператора-человека. Порог размножения может зависеть от общей концентрации, плотности и/или количества культивированных клеток, определенных посредством автоматизированной системы. Альтернативно, порог размножения может зависеть от концентрации, плотности и/или количества жизнеспособных клеток.

[0359] В некоторых вариантах осуществления, собранные клетки составляют, как описано, например, в присутствии фармацевтически приемлемого носителя. В некоторых вариантах осуществления, собранные клетки составляют в присутствии криопротектора.

Г. Малые молекулы в способе

[0360] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам, включающим промышленное получение или получение модифицированных клеток (например, CAR-T-клеток) в присутствии модулирующего средства, таким образом, улучшая персистенцию, отсутствие истощения и/или эффективность модифицированных клеток, полученных или продуцированных способами. В некоторых аспектах, представленными способами получают композиции клеток, включающие первичные Т-клетки модифицированные для экспрессии рекомбинантного рецептора, например, для использования в клеточной терапии, которые (i) содержат меньше истощенных клеток и/или меньше клеток, проявляющих маркеры или фенотипы, ассоциированные с истощением; (ii) содержат увеличенный процент Т-клеток, подобных клеткам памяти, таких как долгоживущие Т-клетки памяти; (iii) являются менее дифференцированными; (iv) имеют улучшенные или усиленные выживаемость, размножение, персистенцию и/или противоопухолевую активность; (v) имеют улучшенную терапевтическую эффективность; и/или (vi) имеют улучшенную клиническую длительность ответа, по сравнению с композициями модифицированных клеток, полученными альтернативными способами, такими как альтернативные способы, не осуществляемые в присутствии модулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, сравнение с альтернативным способом проводят с таким же способом, который отличается только тем, что альтернативный способ не осуществляют в присутствии модулирующего средства.

[0361] В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство находится в контакте с клетками или популяциями клеток (например, модулирующее средство находится в клетке или взаимодействует с одной или несколькими молекулами клеточной поверхности) до накопления, сбора или составления клеток. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство присутствует до, во время или после того, как клетки подвергали стимуляции, например, активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство находится в контакте с клетками или популяциями клеток (например, модулирующее средство находится в клетке или взаимодействует с одной или несколькими молекулами клеточной поверхности) до или во

время стимуляции, например, стимуляции, описанной в настоящем описании, например, в разделе I-C. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство присутствует до, во время или после того, как клетки подвергали модификации, например, трансдукция. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство находится в контакте с клетками или популяциями клеток (например, модулирующее средство находится в клетке или взаимодействует с одной или несколькими молекулами клеточной поверхности) до или во время модификации, например, модификации, описанной в настоящем описании, например, в разделе I-E. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство находится в контакте с клетками или популяциями клеток (например, модулирующее средство находится в клетке или взаимодействует с одной или несколькими молекулами клеточной поверхности) во время или после инкубации, например, инкубации, описанной в настоящем описании, например, в разделе I-E-3. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство находится в контакте с клетками или популяциями клеток (например, модулирующее средство находится в клетке или взаимодействует с одной или несколькими молекулами клеточной поверхности) во время стимуляции (например, стимуляции, описанной в настоящем описании, например, в разделе I-C), во время модификации (модификации, описанной в настоящем описании, например, в разделе I-E) и/или во время инкубации (например, инкубации, описанной в настоящем описании, например, в разделе I-E-3). В конкретных вариантах осуществления, клетки или популяцию клеток подвергают процессу, процедуре, стадии или способу в присутствии модулирующего средства после инкубации, но до стадий накопления, сбора или составления клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки или популяцию клеток подвергают процессу, процедуре, стадии или способу в присутствии модулирующего средства после инкубации.

[0362] В некоторых вариантах осуществления, клетки, подлежащие модификации (например, трансдуцированные), приводят в контакт (например, инкубируют) с модулирующим средством, например, в культуральной среде, до модификации. В некоторых вариантах осуществления, клетки модифицируют в присутствии модулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько модифицированных клеток приводят в контакт (например, инкубируют) с модулирующим средством, например, в культуральной среде, такой как базовая среда, без одного или нескольких рекомбинантных цитокинов или без какого-либо рекомбинантного цитокина. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится также к композициям во время промышленного получения или получения модифицированных клеток, например, для видов терапии на основе клеток, которые содержат (i) модулирующее средство и (ii) клетки, подлежащие модификации, и/или клетки, которые подвергали модификации (включая модифицированные клетки), такие как первичные иммунциты (например, Т-клетки).

[0363] В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство выбрано из группы, состоящей из ингибитора PI3K, пути Akt, ингибитора mTOR, ингибитора

Ras/ERK, ингибитора NF-κB, ингибитора BET, ингибитора CDK, ингибитора канала CRAC, ингибитора Cox, антагониста дофамина, ингибитора ERK5, глюкокортикоида, ингибитора IGF-1R, ингибитора IKK, ингибитора JAK, ингибитора Lck, ингибитора PDK1, ингибитора Raf и ингибитора Syk. В некоторых вариантах осуществления, ингибиторы Src включают, но без ограничения, дазатиниб, саракатиниб, бозутиниб, KX01 и ребастиниб (DCC-2036). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор Src содержит ребастиниб (DCC-2036). Конкретные средства, которые можно использовать в качестве модулирующего средства по настоящему описанию, описаны в WO2019018603, WO2018106595 и PCT/US2018/058812, полное содержание каждой из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0364] В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство представляет собой или содержит соединение, малую молекулу, например, малую органическую молекулу, полинуклеотид, олигонуклеотид, миРНК или полипептид, или их фрагмент, изоформу, вариант, аналог или производное, которые ингибируют, уменьшают, предотвращают и/или являются способными ингибировать, уменьшать или предотвращать один или несколько видов активности мишени, такой как mTOR. В конкретных вариантах осуществления, средство представляет собой малую молекулу с молекулярной массой менее чем 10 кДа, менее чем 9 кДа, менее чем 8 кДа, менее чем 7 кДа, менее чем 6 кДа, менее чем 5 кДа, менее чем 4 кДа, менее чем 3 кДа, менее чем 2 кДа, менее чем 1 кДа, менее чем 0,5 кДа или менее чем 0,1 кДа.

[0365] В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство представляет собой или содержит средство, которое ингибирует активность mTOR. В некоторых вариантах осуществления, клетки, подлежащие модификации (например, трансдуцированные), приводят в контакт (например, инкубируют) с ингибитором mTOR до модификации. В некоторых вариантах осуществления, клетки модифицируют в присутствии ингибитора mTOR. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько модифицированных клеток приводят в контакт (например, инкубируют) с ингибитором mTOR, например, в культуральной среде, такой как базовая среда без одного или нескольких рекомбинантных цитокинов, или без какого-либо рекомбинантного цитокина. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к композициям во время промышленного получения или получения модифицированных клеток, которые содержат (i) ингибитор mTOR и (ii) клетки, подлежащие модификации, и/или клетки, которые подвергали модификации (включая модифицированные клетки).

[0366] В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, ингибирует, уменьшает и/или снижает, и/или является способным ингибировать, уменьшать и/или снижать по меньшей мере одну активность mTOR. В конкретных вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, ингибирует, уменьшает и/или снижает, и/или является способным ингибировать, уменьшать и/или снижать активность киназы mTOR. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, ингибирует, уменьшает

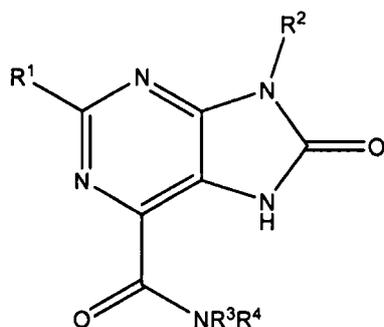
и/или снижает, и/или является способным ингибировать, уменьшать и/или снижать активность mTORC1, например, активность киназы mTORC1, и/или активность mTORC2. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, предотвращает формирование и/или дестабилизирует комплекс mTORC1. В конкретных вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность, предотвращает формирование и/или дестабилизирует комплекс mTORC2.

[0367] В конкретных вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, ингибирует активность по меньшей мере одной дополнительной киназы. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере одна дополнительная киназа представляет собой PI3K. В конкретных вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR: (i) не ингибирует активность PI3K; (ii) не ингибирует на поддающемся детекции уровне активность PI3K при IC_{50} для активности mTOR; и/или (iii) не ингибирует на поддающемся детекции уровне PI3K при всех концентрациях, которые на поддающемся детекции уровне ингибируют активность mTOR. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, ингибирует, например, избирательно ингибирует, активность киназы mTORC1 и mTORC2, относительно активности PI3K. В конкретных вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, ингибирует активность киназы mTORC1 и mTORC2. В конкретных вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, избирательно ингибирует активность mTORC1, например, активность киназы mTORC1.

[0368] В конкретных вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR: (i) не ингибирует активность mTORC2; (ii) не ингибирует на поддающемся детекции уровне активность mTORC2 при IC_{50} для активности mTORC1; и/или (iii) не ингибирует на поддающемся детекции уровне mTORC2 при всех концентрациях, которые на поддающемся детекции уровне ингибируют активность mTORC1.

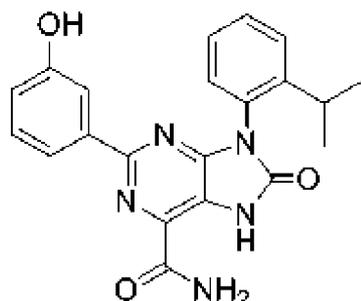
[0369] В некоторых вариантах осуществления, средства, которые ингибируют активность mTOR, включают, но без ограничения, CC214-1 (Celgene), CC214-2 (Celgene), CC0470324, GDC0980, SAR245409, VS5584, PI-103, SF1126, BGT226, XL765, PF-04691502, дактолизиб (имеющий кодовое обозначение NVP-BEZ235 и BEZ-235), пиразолопиримидин, торин I, торкиниб (PP242), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), DS3078a, рапамицин (сиролимус), темсиролимус (CC1779), эверолимус (RAD001), дефоролимус (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca) и OSI-027 (OSI). В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, имеет или включает формулу, представленную в формуле (I), формуле (II) или формуле (III). В некоторых вариантах осуществления, средство представляет собой соединение 155, соединение 246 или соединение 63.

[0370] В конкретных вариантах осуществления, средство содержит формулу, указанную в формуле (I),



Формула (I)

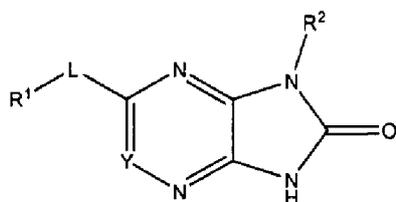
где R^1 представляет собой замещенный или незамещенный C_{1-8} алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, R^2 представляет собой замещенный или незамещенный C_{1-8} алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, и R^3 и R^4 независимо представляют собой H или C_{1-8} алкил. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, представляет собой или содержит соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, представляет собой или содержит соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, представляет собой или содержит 2-(3-гидроксифенил)-9-(2-изопропилфенил)-8-оксо-8,9-дигидро-7H-пурин-6-карбоксамид, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR представляет собой или



содержит

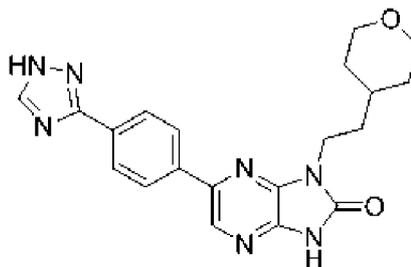
или его фармацевтически приемлемую соль.

[0371] В некоторых вариантах осуществления, средство содержит формулу, указанную в формуле (II),



Формула (II)

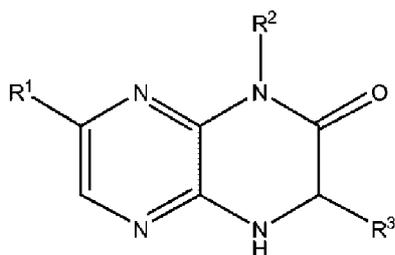
где L представляет собой прямую связь, NH или O, Y представляет собой N или CR³, где R¹ представляет собой H, замещенный или незамещенный C₁₋₈ алкил, замещенный или незамещенный C₂₋₈ алкенил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, R² представляет собой H, замещенный или незамещенный C₁₋₈ алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, R³ представляет собой H, замещенный или незамещенный C₁₋₈ алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, -NHR⁴ или -N(R⁴)₂, и R⁴ в каждом случае независимо представляет собой замещенный или незамещенный C₁₋₈ алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный циклоалкил, или замещенный или незамещенный гетероциклоалкил. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, представляет собой или содержит соединение формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, представляет собой или содержит 6-(4-(2H-1,2,4-триазол-3-ил)фенил)-1-(2-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)этил)-1H-имидазо[4,5-b]пирозин-2(3H)-он, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR,



представляет собой или содержит фармацевтически приемлемую соль.

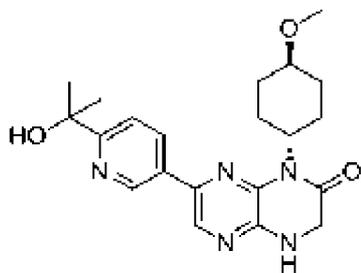
или его

[0372] В конкретных вариантах осуществления, средство содержит формулу, указанную в формуле (III),



Формула (III)

где R^1 представляет собой замещенный или незамещенный C_{1-8} алкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероцикл, или замещенный или незамещенный гетероциклизалкил, R^2 представляет собой H, замещенный или незамещенный C_{1-8} алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероцикл, замещенный или незамещенный гетероциклизалкил, замещенный или незамещенный аралкил, или замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, и R^3 представляет собой H, или замещенный или незамещенный C_{1-8} алкил. В конкретных вариантах осуществления, R^1 представляет собой замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил. В некоторых вариантах осуществления, R^1 представляет собой пиридил, который является замещенным. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, представляет собой или содержит соединение формулы (III), или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, представляет собой или содержит соединение формулы (III) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, представляет собой или содержит 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((1r,4r)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиразин-2(1H)-он или его фармацевтически приемлемую соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления, средство, которое ингибирует активность mTOR, представляет собой или



содержит

или его фармацевтически приемлемую соль.

[0373] Как понятно специалисту в данной области, объем настоящего изобретения также включает аналоги/или производные всех других средств, функционально категоризированных по соответствующему им классу, на основании их мишеней, где

аналоги/или производные включают, но без ограничения, соль, сложный эфир, эфир, сольват, гидрат, стереоизомер или пролекарство.

Г. Сбор и накопление клеток

[0374] В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или накапливают. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или накапливают после завершения инкубации, как описано в разделе I-E-3. В конкретных вариантах осуществления, собранные или накопленные клетки представляют собой клетки из выходной популяции. В некоторых вариантах осуществления, выходная популяция включает клетки, которые являются жизнеспособными, CD3+, CD4+, CD8+ и/или положительными по рекомбинантному рецептору, например, CAR+. В конкретных вариантах осуществления, собранные CD4+ Т-клетки и составленные CD8+ Т-клетки представляют собой выходные CD4+ и CD8+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, составленная популяция клеток, например, составленная популяция обогащенных CD4+ и CD8+ клеток, представляет собой выходную популяцию клеток, например, выходную популяцию обогащенных CD4+ и CD8+ клеток.

[0375] В некоторых вариантах осуществления, клетки или популяцию клеток, собранные, накопленные или составленные, не подвергали никакому размножению, например, никаким условиям, где клетки инкубировали или культивировали в условиях, которые увеличивают количество жизнеспособных клеток во время инкубации или культивирования. Например, в некоторых аспектах, клетки, которые собирают, не подвергали никаким инкубации или культивированию, где общее количество жизнеспособных клеток увеличивается в конце инкубации или культивирования, по сравнению с общим количеством жизнеспособных клеток в начале инкубации или культивирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые собирают, не подвергали никакой стадии инкубации или культивирования явно с целью увеличения (например, размножения) общего количества жизнеспособных клеток в конце процесса инкубации или культивирования, по сравнению с началом указанного процесса инкубации или культивирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют или культивируют в условиях, которые могут приводить к размножению, но условия инкубации или культивирования не осуществляют для целей размножения популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые собирают, могут подвергаться размножению, несмотря на их промышленное получение способом, который не включает стадию размножения. В некоторых вариантах осуществления, производственный процесс, который не включает стадию размножения, обозначен как способ с отсутствием размножения или минимальным размножением. Способ с «отсутствием размножения» может быть также обозначен как способ с «минимальным размножением». В некоторых вариантах осуществления, способ с отсутствием размножения или минимальным размножением может приводить к получению клеток, подвергнутых размножению, несмотря на то, что способ не включает стадию размножения. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые собирают, могли

подвергать стадии инкубации или культивирования, которая включает состав среды, разработанный для уменьшения, супрессии, минимизации или исключения размножения популяции клеток в целом. В некоторых вариантах осуществления, накопленные, собранные или составленные клетки ранее не подвергали инкубации или культивированию, которые осуществляли в биореакторе, или в условиях, где клетки подвергали движению, вращению, встряхиванию, или перфузии в течение всей или части инкубации или культивирования.

[0376] В некоторых вариантах осуществления, клетки или популяцию клеток, собранные, накопленные или составленные, подвергали размножению, например, условиям, где клетки инкубировали или культивировали в условиях, которые увеличивают количество жизнеспособных клеток во время инкубации или культивирования. Например, в некоторых аспектах, клетки, которые собирают, подвергали инкубации или культивированию, где общее количество жизнеспособных клеток увеличивается в конце инкубации или культивирования, по сравнению с общим количеством жизнеспособных клеток в начале инкубации или культивирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые собирают, подвергали стадии инкубации или культивирования явно с целью увеличения (например, размножения) общего количества жизнеспособных клеток в конце процесса инкубации или культивирования, по сравнению с началом указанного процесса инкубации или культивирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые собирают, подвергали стадии инкубации или культивирования, которая включает состав среды, разработанный для облегчения или стимуляции размножения популяции клеток в целом. В некоторых вариантах осуществления, накопленные, собранные или составленные клетки ранее подвергали инкубации или культивированию, которые осуществляли в биореакторе, или в условиях, где клетки подвергали движению, вращению, встряхиванию или перфузии в течение всей или части инкубации или культивирования.

[0377] В некоторых вариантах осуществления, стадию отбора, выделения, разделения, обогащения и/или очистки клеток проводят до сбора, накопления или составления клеток или популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, стадию отбора, выделения, разделения, обогащения и/или очистки клеток проводят с использованием хроматографии, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, стадию отбора Т-клеток посредством хроматографии проводят после трансдукции Т-клеток, но до сбора, до накопления и/или до составления клеток. В некоторых вариантах осуществления, стадию отбора Т-клеток посредством хроматографии проводят непосредственно перед сбором клеток.

[0378] В конкретных вариантах осуществления, количество времени после начала стимуляции (например, стимуляции на колонке) до накопления, сбора или составления клеток составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 24 часов, 36 часов, 42 часов, 48 часов, 54 часов, 60 часов, 72 часов, 84 часов, 96 часов, 108 часов или 120 часов. В некоторых вариантах осуществления, количество времени после начала

стимуляции до накопления, сбора или составления клеток для получения модифицированных клеток, после начала стимуляции до накопления, сбора или составления клеток составляет между точно или приблизительно 12 часов и 24 часов, 36 часов и 120 часов, 48 часов и 96 часов или 48 часов и 72 часов, включительно. В конкретных вариантах осуществления, количество времени от начала инкубации до сбора, накопления или составления клеток составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 48 часов, 72 часа или 96 часов. В конкретных вариантах осуществления, количество времени от начала инкубации до сбора, накопления или составления клеток составляет 48 часов±6 часов, 72 часа±6 часов или 96 часов±6 часов. В конкретных вариантах осуществления, количество времени от начала инкубации до сбора, накопления или составления клеток составляет точно или приблизительно 96 часов или четверо суток.

[0379] В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают, накапливают или составляют в бессывороточной среде, такой как среда, описанная в настоящем описании в разделе III или в PCT/US2018/064627, содержание которой приведено в настоящем описании в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают, накапливают или составляют в такой же бессывороточной среде, какую использовали во время инкубации, например, как описано в настоящем описании в разделе I-E-3.

[0380] В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают, накапливают или составляют в базовой среде, которая не содержит один или несколько рекомбинантных цитокинов и которая не содержит компонент сыворотки, т.е. представляет собой бессывороточную среду, но может содержать один или несколько дополнительных компонентов, таких, как описано в разделе III. В. В конкретных вариантах осуществления, использование таких бессывороточных сред предоставляет бедную среду, обеспечивающую поддержание клеток, но не включающую конкретные факторы, которые могут активировать клетки или делать клетки метаболически активными, таким образом, подкармливая клетки в состоянии, которое является или, вероятно, является состоянием отдыха или покоя. В некоторых аспектах, инкубация в присутствии таких бессывороточных сред позволяет клеткам восстанавливаться после стимуляции (например, в соответствии с разделом I-C) и генетической инженерии (например, трансдукции). В некоторых аспектах, сбор, накопление или составление клеток в присутствии таких бессывороточных сред приводит к составлению выходной композиции (например, терапевтической композиции клеток), содержащей клетки, которые являются менее чувствительными к повреждению или потере жизнеспособности, например, когда собранные/составленные клетки криоконсервируют и затем размораживают непосредственно перед использованием. В некоторых вариантах осуществления, клетки в выходной композиции (например, терапевтической композиции клеток) при размораживании имеют более низкие уровни каспазы или другого маркера апоптоза, чем клетки, которые были инкубированы в сходных средах, но содержащих один или несколько рекомбинантных цитокинов, сыворотку или другие факторы, которые могут

делать клетки более метаболически активными при криоконсервации выходной композиции (например, терапевтической композиции клеток).

[0381] В конкретных вариантах осуществления, составляют одну или несколько популяций обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, одну или несколько популяций обогащенных Т-клеток составляют после того, как одну или несколько популяций модифицировали и/или культивировали. В конкретных вариантах осуществления, одна или несколько популяций представляют собой входные популяции или выходные композиции (например, отобранных и стимулированных клеток). В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько входных популяций или выходных композиций ранее подвергали криозащите и хранению, и размораживают до инкубации (например, инкубации, как описано в разделе I-E-3).

[0382] В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают до, приблизительно до или по меньшей мере до одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, восьми, десяти, двадцати или более удвоений клеток из популяции клеток, например, удвоений, происходящих во время инкубации.

[0383] В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или накапливают в момент времени до того, как общее количество клеток, например, общее количество инкубированных клеток или клеток, подвергающихся инкубации (например, инкубации, как описано в разделе I-E-3), превысит более чем или приблизительно более чем в один, два, три, четыре, пять, шесть, восемь, десять, двадцать или более чем двадцать раз количество клеток из входной популяции, например, общее количество клеток, которые приводили в контакт со стимулирующим реагентом. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или накапливают в момент времени до того как общее количество инкубированных клеток превысит более чем или приблизительно в один, два, три, четыре, пять, шесть, восемь, десять, двадцать или более чем двадцать раз общее количество клеток, которые были трансформированы, трансдуцированы или спинокулированы, например, общее количество клеток, которые приводили в контакт с вирусным вектором. В конкретных вариантах осуществления, клетки представляют собой Т-клетки, жизнеспособные Т-клетки, CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, экспрессирующие CAR Т-клетки или комбинацию любых из вышеуказанных. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или накапливают в момент времени до того, как общее количество клеток превысит общее количество клеток из входной популяции. В различных вариантах осуществления, клетки собирают или накапливают в момент времени до того, как общее количество жизнеспособных CD3+ Т-клеток превысит общее количество жизнеспособных CD3+ клеток из входной популяции. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или накапливают в момент времени до того, как общее количество клеток превысит общее количество клеток из трансформированных, трансдуцированных или спинокулированных клеток. В различных вариантах осуществления, клетки собирают или накапливают в момент времени до того, как общее количество жизнеспособных CD3+ Т-клеток превысит общее количество

жизнеспособных CD3+ из трансформированных, трансдуцированных или спинокулированных клеток.

[0384] В конкретных вариантах осуществления, составленные клетки представляют собой выходные клетки. В некоторых вариантах осуществления, составленная популяция обогащенных Т-клеток представляет собой выходную популяцию обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, составленные CD4+ Т-клетки и составленные CD8+ Т-клетки представляет собой выходные CD4+ и CD8+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, составленная популяция клеток, например, составленная популяция обогащенных CD4+ и CD8+ клеток, представляет собой выходную популяцию клеток, например, выходную популяцию обогащенных CD4+ и CD8+ клеток.

[0385] В некоторых вариантах осуществления, клетки можно составлять в контейнере, таком как пакет или флакон.

[0386] В некоторых вариантах осуществления, клетки составляют в фармацевтически приемлемом буфере, который может, в некоторых аспектах, включать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления, переработка включает замену среды на среду или буфер для составления, которые являются фармацевтически приемлемыми или желательными для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, стадии переработки могут включать промывку трансдуцированных и/или размноженных клеток для замены для клеток фармацевтически приемлемого буфера, который может включать один или несколько необязательных фармацевтически приемлемых носителей или наполнителей. Примеры таких фармацевтических форм, включая фармацевтически приемлемые носители или наполнители, могут представлять собой любые, описанные ниже, в сочетании с формами, приемлемыми для введения клеток и композиций субъекту. Фармацевтическая композиция, в некоторых вариантах осуществления, содержит клетки в количествах, эффективных для лечения или предотвращения заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество.

[0387] «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.

[0388] 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 EDTA; 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).

[0389] 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).

[0390] Составы могут включать водные растворы. Состав или композиция могут также содержать более одного активного ингредиента, которые можно использовать для конкретного признака, заболевания или состояния, подвергаемых лечению с использованием клеток, предпочтительно, ингредиенты с активностью, дополняющей активность клеток, 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 и/или винкристин.

[0391] 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 pH. Жидкие 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. Стерильные пригодные для инъекции растворы можно получать посредством включения клеток в растворитель, например, в смеси с пригодным носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, физиологический солевой раствор, глюкоза, декстроза или т.п. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие, диспергирующие вещества или эмульгаторы (например, метилцеллюлозу), забуферивающие рН средства, гелеобразующие или повышающие вязкость добавки, консерванты, ароматизаторы и/или окрашивающие средства, в зависимости от желательного способа введения и получения. В некоторых аспектах, можно консультироваться со стандартными руководствами для получения пригодных препаратов.

[0392] Различные добавки, которые повышают стабильность и стерильность композиции, включая противомикробные консерванты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и буферы, можно добавлять. Предотвращение действия микроорганизмов можно обеспечивать посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола и сорбиновой кислоты. Длительную абсорбцию пригодной для инъекции фармацевтической формы можно получать с использованием средств, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0393] В некоторых вариантах осуществления, буфер для составления содержит криоконсервант. В некоторых вариантах осуществления, клетки составляют с раствором криоконсерванта, который содержит раствор 1,0%-30% DMSO, такой как раствор 5%-20% DMSO или раствор 5%-10% DMSO. В некоторых вариантах осуществления, раствор криоконсерванта представляет собой или содержит, например, PBS, содержащий 20% DMSO и 8% человеческого сывороточного альбумина (HSA), или другие пригодные среды для замораживания клеток. В некоторых вариантах осуществления, раствор криоконсерванта представляет собой или содержит, например, по меньшей мере или приблизительно 7,5% DMSO. В некоторых вариантах осуществления, стадии переработки могут включать промывку трансдуцированных и/или размноженных клеток для замены для клеток раствора криоконсерванта. В некоторых вариантах осуществления, клетки замораживают, например, подвергают криозащите или криоконсервированию, в средах и/или растворе с конечной концентрацией точно или приблизительно 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9,0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5% или 5,0% DMSO, или между 1% и 15%, между 6% и 12%, между 5% и 10%, или между 6% и 8% DMSO. В конкретных вариантах осуществления, клетки замораживают, например, подвергают криозащите или криоконсервированию, в средах и/или растворе с конечной концентрацией точно или приблизительно 5,0%, 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%,

1,25%, 1,0%, 0,75%, 0,5%, или 0,25% HSA, или между 0,1% и 5%, между 0,25% и 4%, между 0,5% и 2%, или между 1% и 2% HSA.

[0394] В конкретных вариантах осуществления, композицию обогащенных Т-клеток, например, Т-клеток, которые были стимулированы, модифицированы и/или культивированы, подвергают составлению, криозащите и затем хранят в течение некоторого количества времени. В конкретных вариантах осуществления, подвергнутые составлению, криозащите клетки хранят до выпуска клеток для инфузии. В конкретных вариантах осуществления, составленные подвергнутые криозащите клетки хранят в течение между 1 сутками и 6 месяцами, между 1 месяцем и 3 месяцами, между 1 сутками и 14 суток, между 1 сутками и 7 сутками, между 3 сутками и 6 сутками, между 6 месяцами и 12 месяцами, или дольше, чем 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, клетки подвергают криозащите и хранят в течение, в течение приблизительно, или в течение менее чем 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток или 7 суток. В конкретных вариантах осуществления, клетки размораживают и вводят субъекту после хранения. В конкретных вариантах осуществления, клетки хранят в течение точно или приблизительно 5 суток. В некоторых вариантах осуществления, составленные клетки не криоконсервируют.

[0395] В некоторых вариантах осуществления, составлению проводят с использованием одной или нескольких стадий переработки, включая промывку, разведение или концентрирование клеток, таких как культивированные или размноженные клетки. В некоторых вариантах осуществления, переработка может включать разведение или концентрирование клеток до желательной концентрации или количества, таких как форма единичных доз композиций, включая количество клеток для введения в данной дозе или ее доле. В некоторых вариантах осуществления, стадии переработки могут включать уменьшение объема, чтобы таким образом, увеличивать концентрацию клеток, как желательно. В некоторых вариантах осуществления, стадии переработки могут включать дополнение объема, чтобы таким образом уменьшать концентрацию клеток, как желательно. В некоторых вариантах осуществления, переработка включает добавление некоторого объема буфера для составления к трансдуцированным и/или размноженным клеткам. В некоторых вариантах осуществления, объем буфера состава составляет от точно или приблизительно 10 мл до 1000 мл, например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно или точно 50 мл, 100 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл или 1000 мл.

[0396] В некоторых вариантах осуществления, такие стадии переработки для составления композиции клеток проводят в закрытой системе. Примеры таких стадий переработки можно проводить с использованием камеры для центрифугирования в сочетании с одной или несколькими системами или наборами, ассоциированными с системой для переработки клеток, такой как камера для центрифугирования, производимая и продаваемая в Biosafe SA, включая камеры для использования с

системами для переработки клеток Serax® или Serax 2®. Иллюстративная система и способ описаны в Международной патентной публикации номер WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления, способ включает осуществление вытеснения из внутренней полости камеры для центрифугирования составленной композиции, которая представляет собой полученную композицию клеток, составленную в буфере для составления, таком как фармацевтически приемлемый буфер, в любом из вышеуказанных вариантах осуществления, как описано. В некоторых вариантах осуществления, вытеснение составленной композиции осуществляют в контейнер, такой как пакет, функционально связанный, в качестве части закрытой системы, с камерой для центрифугирования. В некоторых вариантах осуществления, контейнер, такой как пакет, соединен с системой в выходной линии/или выходном положении.

[0397] В некоторых вариантах осуществления, закрытая система, например, ассоциированная с камерой для центрифугирования или системой для переработки клеток, включает комплект многопортового выхода, содержащий многоканальный трубный коллектор, связанный с каждого конца линии трубок с портом, с которым можно соединять один или множество из контейнеров для вытеснения составленной композиции. В некоторых аспектах, желательное количество или множество выходных контейнеров, например, пакетов, можно стерильно соединять с одним или несколькими, как правило, двумя или более, например, по меньшей мере с 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более из портов многопортового выхода. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько контейнеров, например, пакетов, можно соединять с портами, или менее, чем со всеми из портов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, система может осуществлять вытеснение выходной композиции в множество выходных пакетов.

[0398] В некоторых аспектах, клетки можно вытеснять в один или несколько из множества выходных пакетов в количестве для введения дозы, например, для введения однократной единичной дозы или введения множественных доз. Например, в некоторых вариантах осуществления, каждый из выходных пакетов может содержать определенное количество клеток для введения в данной дозе или ее доле. Таким образом, каждый пакет, в некоторых аспектах, может содержать однократную единичную дозу для введения или может содержать долю желательной дозы, так что более чем один из множества выходных пакетов, например, два выходных пакета или 3 выходных пакета, совместно составляют дозу для введения.

[0399] Таким образом, контейнеры, например, выходные пакеты, как правило, содержат клетки, подлежащие введению, например, одну или несколько их единичных доз. Единичная доза может представлять собой количество или число клеток, подлежащих введению субъекту, или двойное количество (или более) клеток, подлежащих введению. Она может представлять собой низшую дозу или низшую возможную дозу клеток, которую можно вводить субъекту.

[0400] В некоторых вариантах осуществления, каждый из контейнеров, например, пакетов, индивидуально содержит единичную дозу клеток. Таким образом в некоторых

вариантах осуществления, каждый из контейнеров содержит одинаковое, или приблизительно или по существу одинаковое количество клеток. В некоторых вариантах осуществления, каждая единичная доза содержит по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 или 1×10^8 модифицированных клеток, тотальных клеток, Т-клеток или РВМС. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной композиции клеток в каждом пакете составляет 10 мл-100 мл, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл или 100 мл.

[0401] В некоторых вариантах осуществления, такие клетки, полученные способом, или композицию, содержащую такие клетки, вводят субъекту для лечения заболевания или состояния.

Н. Удаление стимулирующих реагентов

[0402] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент (например, олигомерный стимулирующий реагент) удаляют или отделяют из собранных клеток или популяций клеток после накопления, сбора или составления клеток. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие реагенты удаляют или отделяют из клеток или популяций клеток после сбора из хроматографической колонки, например, после стадии элюции и сбора клеток, как описано в разделе I-D. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие реагенты удаляют или отделяют из клеток или популяций клеток после или во время инкубации, например, инкубации, описанной в настоящем описании, например, в разделе I-E-3. В конкретных вариантах осуществления, клетки или популяцию клеток подвергают процессу, процедуре, стадии или способу удаления стимулирующего реагента (например, олигомерного стимулирующего реагента) после инкубации но до стадий накопления, сбора или составления клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки или популяцию клеток подвергают процессу, процедуре, стадии или способу удаления стимулирующего реагента (например, олигомерного стимулирующего реагента) после инкубации. В некоторых аспектах, когда стимулирующий реагент (например, олигомерный стимулирующий реагент) отделяют или удаляют из клеток во время инкубации, клетки возвращают в такие же условия инкубации, как перед отделением или удалением, на оставшуюся длительность инкубации.

[0403] В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент (например, олигомерный стимулирующий реагент) удаляют и/или отделяют из клеток. Без намерения быть связанными теорией, конкретные варианты осуществления предусматривают, что связыванию и/или ассоциации между стимулирующим реагентом (например, олигомерным стимулирующим реагентом) и клетками можно, в некоторых условиях, уменьшать с течением времени во время инкубации. В конкретных вариантах осуществления, одно или несколько средств можно добавлять для уменьшения связывания и/или ассоциации между стимулирующим реагентом и клетками. В конкретных вариантах осуществления, изменение условий культивирования клеток,

например, добавление средства (например, вещества, такого как конкурентное средство или свободное связывающее средство), может уменьшать связывание и/или ассоциацию между стимулирующим реагентом и клетками. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент (например, олигомерный стимулирующий реагент) можно удалять из инкубации, культуральной системы и/или раствора отдельно от клеток, например, без удаления также клеток из инкубации, культуральной системы и/или раствора.

[0404] В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент (например, олигомерный стимулирующий реагент) отделяют и/или удаляют из клеток после некоторого количества времени. В конкретных вариантах осуществления, количество времени представляет собой количество времени после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, началом инкубации считают точно или приблизительно время, когда клетки приводят в контакт со стимулирующим реагентом и/или средой или раствором, содержащими стимулирующий реагент. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют или отделяют из клеток в пределах точно или приблизительно 120 часов, 108 часов, 96 часов, 84 часов, 72 часов, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов, 12 часов, 6 часов, 5 часов, 4 часов, 3 часов или 2 часов, включительно, после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент (например, олигомерный стимулирующий реагент) удаляют или отделяют из клеток через точно или приблизительно 48 часов после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют или отделяют из клеток через точно или приблизительно 72 часа после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют или отделяют из клеток через точно или приблизительно 96 часов после начала стимуляции.

1. Удаление олигомерных стимулирующих реагентов

[0405] В некоторых вариантах осуществления, популяцию стимулированных клеток (т.е., клеток, подвергнутых отбору с использованием хроматографии на колонке и стимуляции на колонке как описано в настоящем описании), продуцированных или полученных в соответствии с любыми способами, представленными в настоящем описании, подвергают добавлению вещества, такого как конкурентное средство или свободное связывающее средство, например, для уменьшения и/или прекращения передачи сигналов стимулирующего средства или средства. В некоторых вариантах осуществления, добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства происходит после стадии элюции, как описано в настоящем описании (см. раздел I-D). В некоторых вариантах осуществления, добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства происходит после стадии генетической инженерии, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства происходит после стадии сбора, как описано в настоящем описании. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, популяция стимулированных клеток имеет присутствие вещества, такого

как конкурентное средство, например, биотин или аналог биотина, например, D-биотин. В некоторых вариантах осуществления, вещество, такое как конкурентное средство, например, биотин или аналог биотина, например, D-биотин, присутствует в количестве, которое по меньшей мере в 1,5 раз превышает, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 1000 раз или более превышает количество вещества в эталонной популяции или препарате культивированных клеток (например, Т-клеток), в которые вещество не добавлено экзогенно во время одной из вышеупомянутых стадий. В некоторых вариантах осуществления, количество вещества, такого как конкурентное средство, например, биотин или аналог биотина, например, D-биотин, в популяции стимулированных клеток составляет от точно или приблизительно 10 мкМ до 100 мкМ, от 100 мкМ до 1 мМ, от 100 мкМ до 500 мкМ или от 10 мкМ до 100 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, 10 мкМ или приблизительно 10 мкМ биотин или аналог биотина, например, D-биотин, добавляют к клеткам или популяции клеток для отделения или удаления олигомерного стимулирующего реагента из клеток или популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, 1 мМ или приблизительно 1 мМ биотин или аналог биотина, например, D-биотин, добавляют к клеткам или популяции клеток для отделения или удаления олигомерного стимулирующего реагента из клеток или популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, 1 мМ или приблизительно 1 мМ D-биотин добавляют к клеткам или популяции клеток для отделения или удаления олигомерного стимулирующего реагента из клеток или популяция клеток.

[0406] В конкретных вариантах осуществления, одно или несколько стимулирующих средств (например, средств, которые стимулируют или активируют TCR и/или костимулирующую молекулу) ассоциированы, например, обратимо связаны, с олигомерным реагентом, например, посредством множества конкретных участков связывания (например, участков связывания Z), присутствующих на олигомерном реагенте. В некоторых случаях, это приводит к тому, что средства для отбора расположены близко друг с другом, так что эффект avidности может иметь место, если клетку-мишень, имеющую (по меньшей мере две копии) молекулу клеточной поверхности, связываемую или узнаваемую стимулирующим средством, приводят в контакт с средством. В некоторых аспектах, стимулирующее средство имеет низкую аффинность к молекуле клетки в участке связывания B, так что связывающий рецептор реагент диссоциирует от клетки в присутствии конкурентного реагента. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, стимулирующие средства удаляют из клеток в присутствии конкурентного реагента.

[0407] В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент представляет собой олигомер мутеина стрептавидина с обратимо присоединенным Fab против CD3 и против CD28. В некоторых вариантах осуществления, присоединенные Fab содержат связывающие стрептавидин домены, например, позволяющие обратимое присоединение к олигомеру мутеина стрептавидина. В

некоторых случаях, Fab против CD3 и против CD28 расположены близко друг с другом, так что эффект авидности может иметь место, если Т-клетку, экспрессирующую CD3 и/или CD28, приводят в контакт с олигомерным стимулирующим реагентом с обратимо присоединенными Fab. В некоторых аспектах, Fab имеют низкую аффинность для CD3 и CD28, так что Fab диссоциируют от клетки в присутствии конкурентного реагента, например, биотина или варианта или аналога биотина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, Fab удаляют или диссоциируют из клеток в присутствии конкурентного реагента, например, D-биотин.

[0408] В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеин стрептавидина, удаляют или отделяют из клеток или популяций клеток до сбора или составления клеток. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеин стрептавидина, удаляют или отделяют из клеток или популяций клеток посредством контакта или воздействия конкурентного реагента, например, биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, после или во время инкубации, например, инкубации, описанной в настоящем описании, например, в разделе I-F или раздел I-E-3. В конкретных вариантах осуществления, клетки или популяцию клеток подвергают контакту или воздействию конкурентного реагента, например, биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, для удаления олигомерного стимулирующего реагента, например, стимулирующего олигомерного реагента мутеина стрептавидина, после инкубации, но до стадий генетической модификации, сбора или составления клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки или популяцию клеток подвергают контакту или воздействию конкурентного реагента, например, биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, для удаления олигомерного стимулирующего реагента, например, олигомерного стимулирующего реагента мутеина стрептавидина, после инкубации. В некоторых аспектах, когда олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеин стрептавидина, отделяют или удаляют из клеток во время инкубации (см. раздел I-E-3), например, посредством контакта или воздействия конкурентного реагента, например, биотина или аналога биотина, такого как олигомерный стимулирующий реагент D-биотин, клетки возвращают в такие же условия инкубации, как перед отделением или удалением, на оставшуюся длительность инкубации.

[0409] В некоторых вариантах осуществления, клетки приводят в контакт с, приблизительно с или по меньшей мере с 0,01 мкМ, 0,05 мкМ, 0,1 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ, 0,01 мМ, 1 мМ или 10 мМ конкурентным реагентом для удаления или отделения олигомерного стимулирующего реагента из клеток. В различных вариантах осуществления, клетки приводят в контакт с, приблизительно с или по меньшей мере с 0,01 мкМ, 0,05 мкМ, 0,1 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ, 0,01 мМ, 1 мМ или 10 мМ биотином или аналогом биотина, таким как D-биотин, для удаления или отделения

стимулирующих олигомеров мутеина стрептавидина с обратимо присоединенным Fab против CD3 и против CD28, из клеток. В различных вариантах осуществления, клетки приводят в контакт с между точно или приблизительно 100 мкМ и 10 мМ, например, 1 мМ, биотином или аналогом биотина, таким как D-биотин, для удаления или отделения стимулирующего олигомерного реагента, такого как олигомеры мутеина стрептавидина с обратимо присоединенным Fab против CD3 и против CD28, из клеток. В различных вариантах осуществления, клетки приводят в контакт с между точно или приблизительно 100 мкМ и 10 мМ, например, 1 мМ, биотином или аналогом биотина, таким как D-биотин, в течение точно или приблизительно 2 часов, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 30 часов, 36 часов, 42 часов или 48 часов после контакта или воздействия D-биотина.

[0410] В конкретных вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеин стрептавидина, удаляют или отделяют из клеток в пределах точно или приблизительно 120 часов, 108 часов, 96 часов, 84 часов, 72 часов, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов или 12 часов, включительно, после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеин стрептавидина, удаляют или отделяют из клеток через точно или приблизительно 48 часов после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеин стрептавидина, удаляют или отделяют из клеток через точно или приблизительно 72 часа после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеин стрептавидина, удаляют или отделяют из клеток через точно или приблизительно 96 часов после начала стимуляции.

[0411] В конкретных вариантах осуществления, клетки или популяцию клеток подвергают контакту или воздействию конкурентного реагента, например, биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, для удаления стимулирующего олигомерного реагента, например, стимулирующего олигомерного реагента мутеина стрептавидина, через точно или приблизительно 48 часов или через точно или приблизительно 2 суток после начала стимуляции, например, во время или после инкубации, описанной в настоящем описании, например, в разделе I-E-3. В некоторых аспектах, когда стимулирующий олигомерный реагент, например, стимулирующий олигомерный реагент мутеин стрептавидина, отделяют или удаляют из клеток во время инкубации, например, посредством контакта или воздействия конкурентного реагента, например, биотина или аналога биотина, такого как олигомерный стимулирующий реагент D-биотин, клетки возвращают в такие же условия инкубации, как перед отделением или удалением, на оставшуюся длительность инкубации. В других аспектах, когда стимулирующий олигомерный реагент, например, стимулирующий олигомерный реагент мутеин стрептавидина, отделяют или удаляют из клеток после инкубации, например, посредством контакта или воздействия конкурентного реагента, например, биотина или аналога

биотина, такого как олигомерный стимулирующий реагент D-биотин, клетки дополнительно инкубируют в течение точно или приблизительно 2 часов, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 30 часов, 36 часов, 42 часов или 48 часов после контакта или воздействия конкурентного реагента. В некоторых вариантах осуществления, трансдуцированные клетки с обработкой D-биотином дополнительно инкубируют в течение точно или приблизительно 24 ± 6 часов после добавления D-биотина. В некоторых вариантах осуществления, трансдуцированные клетки с обработкой D-биотином дополнительно инкубируют в течение точно или приблизительно 48 часов после добавления D-биотина.

I. Последовательный отбор, параллельный отбор и окончательная очистка

[0412] Способы, представленные в настоящем описании, позволяют множество стадий отбора, например, посредством колоночной хроматографии, для выделения и/или обогащения целевой популяции клеток (например, Т-клеток, CD3+, CD4+, CD8+ Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько стадий отбора проводят в одной или нескольких временных точках или после конкретных стадий способа получения выходной композиции модифицированных клеток (например, терапевтической композиции клеток), например, способа, как описано в разделах IА-Н выше. В некоторых вариантах осуществления, стадии отбора, происходящие после начального отбора клеток, например, как описано в разделах I-B и I-C, обозначены как стадии окончательной очистки. Стадии окончательной очистки можно осуществлять для множества целей, включая, но без ограничения, дополнительную очистку композиций клеток, отбор специфических подтипов клеток (например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клеток), удаление мертвых клеток (например, отбор жизнеспособных клеток), отбор успешно модифицированных клеток (например, клеток, экспрессирующих трансген (например, химерный рецептор антигена (CAR), Т-клеточный рецептор (TCR) и т.д.), или для коррекции соотношения, общего количества или концентрации специфических типов клеток (например, CD4+ к CD8+ клеткам, CAR+ или TCR+ клеток к CAR- или TCR- клеткам, или общего количества или концентрации CD4+, CD8+, CAR+, TCR+ и/или жизнеспособных клеток). В некоторых вариантах осуществления, стадию отбора (например, стадию окончательной очистки) можно использовать для увеличения контроля продукта и/или уменьшения изменчивости между пациентами.

[0413] В некоторых вариантах осуществления, стадия отбора (например, стадия начального отбора и/или стадия окончательной очистки) включает множество стадий отбора, например, дополнительной очистки композиции клеток, отбора специфических подтипов клеток, отбора жизнеспособных клеток, отбора модифицированных клеток, и/или коррекции соотношения, общего количества или концентрации клеток. В некоторых вариантах осуществления, стадию отбора (например, стадию окончательной очистки) проводят до инкубации, например, инкубации, как описано в разделах I-E-3 и/или I-F. В некоторых вариантах осуществления, стадию отбора (например, стадию окончательной

очистки) проводят до сбора и накопления, например, сбора и накопления, как описано в I-H.

[0414] В некоторых аспектах, такие способы (например, стадии отбора (например, стадии начального отбора и/или окончательной очистки)) осуществляют посредством одного технологического потока, например, в закрытой системе, посредством использования последовательных отборов, в которых множество различных популяций клеток из образца (например, выходной композиции стимулированных и/или модифицированных клеток), как представлено в настоящем описании, обогащают и/или выделяют. В некоторых аспектах, проведение отделения или выделения в одном и том же сосуде или наборе сосудов, например, комплекте трубок, достигают посредством проведения последовательных стадий положительного и отрицательного отбора, где на последующей стадии подвергают отрицательную и/или положительную фракцию с предшествующей стадии дополнительному отбору, где весь процесс проводят в одной и той же пробирке или комплекте трубок. В одном варианте осуществления, образец (например, выходную композицию стимулированных и/или модифицированных клеток), содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному отбору, в котором первый отбор проводят для обогащения по одной из CD4+ или CD8+ популяций, и неотобранные клетки из первого отбора используют в качестве источника клеток для второго отбора для обогащения по отличному от CD4+ или CD8+ популяциям. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям из одной или обеих из CD4+ или CD8+ популяций, например, центральным Т-клеткам памяти (Т_{СМ}) или наивным Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления, специфические субпопуляции Т-клеток (например, CD3+, CD4+, CD8+ клетки), такие как клетки, положительные по или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клетки, отбирают посредством способов положительного или отрицательного отбора во время стадии отбора (например, стадии начального отбора и/или стадии окончательной очистки). В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток (например, выходную композицию стимулированных и/или модифицированных клеток), содержащую клетки-мишени, подвергают последовательному отбору, в котором на стадии окончательной очистки отбирают жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления, стадия окончательной очистки позволяет контроль или коррекцию соотношения или общего количества клеток в композиции клеток.

[0415] В одном варианте осуществления, образец (например, выходную композицию стимулированных и/или модифицированных клеток), содержащую клетки-мишени, подвергают последовательному отбору, в котором первый отбор проводят для обогащения по CD3+ популяции. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям из CD3+ популяции, например, CD4+ клеткам. В некоторых вариантах осуществления,

дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям из CD3+ популяции, например, CD8+ клеткам. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по жизнеспособным клеткам. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно осуществлять для обогащения субпопуляций CD3+ клеток, например, CD3+CD4+ и/или CD3+CD8+ клеток, которые являются жизнеспособными. В некоторых вариантах осуществления, отбор жизнеспособных клетки включает или состоит из удаления мертвых клеток из популяции клеток (например, выходной композиции стимулированных и/или модифицированных клеток, или их субпопуляций).

[0416] В некоторых вариантах осуществления, способы (например, стадии отбора (например, стадию начального отбора и/или стадии окончательной очистки)), описанные в этом разделе, необязательно проводить с использованием способов последовательного отбора. В некоторых вариантах осуществления, способы (например, стадии отбора (например, стадии начального отбора и/или окончательной очистки)), описанные в этом разделе, можно проводить с использованием способов последовательного отбора в комбинации с параллельными способами отбора. В некоторых вариантах осуществления, на стадии отбора (например, стадию начального отбора и/или окончательной очистки) не используют последовательный отбор или могут использовать последовательный отбор, который не происходит в закрытой системе или в наборе сосудов с использованием тех же трубок. В некоторых вариантах осуществления, стадию отбора (например, стадию начального отбора и/или окончательной очистки) осуществляют за одну стадию, например, с использованием одной хроматографической колонки. В некоторых вариантах осуществления, стадию отбора (например, стадию начального отбора и/или окончательной очистки) осуществляют с использованием способа параллельного отбора. Например, стадию отбора (например, стадию начального отбора и/или окончательной очистки) осуществляют посредством проведения стадий положительного и/или отрицательного отбора одновременно, например, в закрытой системе где весь процесс проводят в одной и той же пробирке или комплекте трубок. В некоторых вариантах осуществления, образец (например, выходную композицию стимулированных и/или модифицированных клеток), содержащий клетки-мишени, подвергают параллельному отбору, в котором образец (например, выходную композицию стимулированных и/или модифицированных клеток) наносят на две или более хроматографических колонки, где каждая колонка осуществляет отбор популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, две или более хроматографических колонки осуществляют отбор CD3+, CD4+, или CD8+ популяций индивидуально. В некоторых вариантах осуществления, две или более хроматографических колонки осуществляют отбор одной и той же популяции клеток. Например, две или более хроматографических колонки могут осуществлять отбор CD3+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, две или более хроматографических колонки, включая аффинную хроматографию или гель-проникающую хроматографию, независимо осуществляют отбор одной и той же популяции клеток. В некоторых

вариантах осуществления, две или более хроматографических колонки, включая аффинную хроматографию или гель-проникающую хроматографию, независимо осуществляют отбор различных популяций клеток. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям из одной или всех популяций клеток, отобранных посредством параллельного отбора. Например, отобранные клетки можно дополнительно отбирать по центральным Т-клеткам памяти (T_{CM}) или наивным Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления, образец (например, выходную композицию стимулированных и/или модифицированных клеток), содержащий клетки-мишени (например, CD3+ клетки), подвергают параллельному отбору, в котором параллельный отбор проводят для обогащения по CD4+ популяции и CD8+ популяции. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям из CD4+ и CD8+ популяций, например, центральным Т-клеткам памяти (T_{CM}) или наивным Т-клеткам. Предусматривают, что, в некоторых аспектах, специфические субпопуляции Т-клеток (например, CD3+, CD4+, CD8+ Т-клетки), такие как клетки, положительные по или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клетки, отбирают посредством способов положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления, образец (например, выходную композицию стимулированных и/или модифицированных клеток), содержащий клетки-мишени (например, CD3+ клетки), подвергают параллельному отбору, в котором параллельный отбор проводят для обогащения по центральным Т-клеткам памяти (T_{CM}) или наивным Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный отбор или отборы можно проводить для обогащения по субпопуляциям центральных Т-клеток памяти (T_{CM}) или наивных Т-клеток, например, CD4+, CD3+ или CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, дополнительные отборы проводят после осуществления параллельного отбора посредством способов последовательного отбора.

[0417] В некоторых вариантах осуществления, стадию отбора (например, стадию начального отбора и/или окончательной очистки) можно проводить с использованием бусин, меченных средствами для отбора, как описано в настоящем описании, и положительную и отрицательную фракции с первой стадии отбора можно сохранять, с последующим дополнительным положительным отбором положительной фракции для обогащения по второму селективному маркеру, например, с использованием бусин, меченных вторым средством для отбора, или посредством подвергания положительной фракции хроматографии на колонке, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько стадий окончательной очистки проводят с использованием хроматографии на колонке, как описано в настоящем описании, например, хроматографии, как описано в разделе I-B, и/или хроматографии, включающей средство и системы реагентов, как описано в разделе I-B и разделе II. В некоторых

вариантах осуществления, стадии отбора (например, стадии начального отбора и/или окончательной очистки) осуществляют с использованием одного или несколько способов, включая разделение на бусинах и хроматографию на колонке. В некоторых вариантах осуществления, стадии отбора (например, стадии начального отбора и/или окончательной очистки) осуществляют с использованием хроматография на колонке.

[0418] В некоторых аспектах, выделение множества популяций в одном или таком же сосуде или наборе сосудов для выделения или разделения, таком как одна колонка или набор колонок, и/или одна и та же трубка или комплект трубок, или с использованием таких же матрикса или сред, или реагентов для разделения, например, таких же магнитного матрикса, аффинно-меченой твердой подложки, или антител или других партнеров по связыванию, включает признаки, осуществляющие поток выделения, например, приводящие к уменьшению затрат, времени, сложности, необходимости манипуляции с образцами, использования ресурсов, реагентов или оборудования. В некоторых аспектах, такие признаки обеспечивают те преимущества, что они минимизируют стоимость, эффективность, время и/или сложность, ассоциированные со способами, и/или исключают потенциальный вред для продукта клеток, такой как вред, вызванный инфекцией, контаминацией и/или изменениями температуры. Способы, представленные в настоящем описании, позволяют множество стадий отбора для обогащения целевых популяций до или после отбора клеток, объединенного со стимуляцией на колонке.

[0419] Способы, представленные в настоящем описании, дополнительно позволяют отбор и обогащение успешно стимулированных и модифицированных клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления, способы последовательного отбора, параллельного отбора или однократного отбора, описанные выше, можно использовать для идентификации стимулированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы (например, CAR, TCR). В некоторых вариантах осуществления, успешно модифицированные клетки можно отбирать с использованием средства для отбора, который может специфически связывать суррогатный маркер (например, см. раздел IV-A-1). В некоторых вариантах осуществления, клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор (например, CAR), можно дополнительно обогащать (например, окончательно очищать) по субпопуляциям клеток, например, CD4+ CAR+ Т-клеток, CD8+ CAR+ Т-клеток, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD45RA+, CD45RO+ Т-клеток и/или жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления, стадия отбора (например, стадия начального отбора и/или окончательной очистки) позволяет контроль или коррекцию соотношения, концентрации или общего количества клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR, TCR) и/или их субпопуляций. В некоторых вариантах осуществления, обогащенные (например, окончательно очищенные) популяции можно составлять для использования (например, введения) для клеточной терапии.

J. Иллюстративные признаки способа и/или выходных популяций

[0420] В конкретных вариантах осуществления, представленные способы используют в сочетании со способом, которым продуцируют или получают выходную популяцию модифицированных Т-клеток (например, терапевтическую популяцию клеток) из одной или нескольких входных популяций, таких как входные популяции, полученные, отобранные или обогащенные из одного биологического образца. В конкретных вариантах осуществления, выходная популяция содержит клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, например, TCR или CAR. В конкретных вариантах осуществления, клетки из выходных популяций являются пригодными для введения субъекту в качестве терапии, например, аутологичной клеточной терапии.

[0421] В конкретных вариантах осуществления, представленные способы используют в сочетании с полным способом получения или продукции выходных клеток и/или выходных популяций модифицированных Т-клеток, таким как способ, включающий некоторые или все из стадий: отбора и стимуляции клеток с использованием хроматографии на колонке за одну стадию; сбора спонтанно открепившихся клеток без использования конкурентного реагента; модификации, трансформации, трансдукции или трансфекции стимулированных клеток для экспрессии/или содержания гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, например, полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, такой как CAR; инкубации клеток, удаления или отделения стимулирующего реагента (например, олигомерного стимулирующего реагента) из клеток, и сбора и накопления клеток, в некоторых аспектах, таким образом, получения выходной популяции модифицированных Т-клеток.

[0422] В некоторых вариантах осуществления, представленные способы используют в сочетании с полным способом получения или продукции выходных клеток и/или выходных композиций обогащенных Т-клеток, таким как способ, включающий некоторые или все из стадий: сбора или получения биологического образца; выделения, отбора или обогащения входных клеток из биологического образца; криозамораживания и хранения, и затем размораживания входных клеток; отбора и стимуляции клетки с использованием хроматографии на колонке за одну стадию; сбора спонтанно открепившихся клеток без использования конкурентного реагента; генетической модификации стимулированных клеток для экспрессии/или содержания рекомбинантного полинуклеотида, например, полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, такой как CAR; составления культивированных клеток в выходную композицию; и криозамораживания и хранения составленных выходных клеток до выпуска клеток для инфузии и/или введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы не включают стадию размножения или увеличения количества клеток в ходе способа, например, посредством культивирования клеток в биореакторе в условиях, в которых клетки размножаются, например, до порогового количества, которое по меньшей мере в 3, 4, 5 или более раз превышает количество, уровень или концентрацию клеток, по сравнению с входной популяцией. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы включают стадию размножения или увеличения

количества клеток в ходе способа, например, посредством инкубации или культивирования клеток в биореакторе в условиях, в которых клетки размножаются, например, до порогового количества, которое по меньшей мере в 2, 3, 4, 5 или более раз превышает количество, уровень или концентрацию клеток, по сравнению с входной популяцией. В некоторых вариантах осуществления, генетическая модификация клеток представляет собой или включает стадии трансдукции клеток вирусным вектором, например, посредством спинокуляции клеток в присутствии вирусных частиц, и затем инкубации клеток в статических условиях в присутствии вирусных частиц.

[0423] В конкретных вариантах осуществления, общая продолжительность представленного способа получения модифицированных клеток, после начала стимуляции до накопления, сбора или составления клеток составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 36 часов, 42 часа, 48 часов, 54 часов, 60 часов, 72 часа, 84 часа, 96 часов, 108 часов или 120 часов. В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность представленного способа получения модифицированных клеток, после начала стимуляции до накопления, сбора или составления клеток составляет между точно или приблизительно 36 часов и 120 часов, 48 часов и 96 часов, или 48 часов и 72 часа, включительно. В конкретных вариантах осуществления, количество времени до завершения представленного способа, как измерено от начала инкубации до сбора, накопления или составления клеток, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 48 часов, 72 часа или 96 часов. В конкретных вариантах осуществления, количество времени до завершения представленного способа, как измерено от начала инкубации до сбора, накопления или составления клеток, составляет 48 часов \pm 6 часов, 72 часа \pm 6 часов, или 96 часов \pm 6 часов.

[0424] В некоторых вариантах осуществления, инкубацию завершают между точно или приблизительно 24 часа и 120 часов, 36 часов и 108 часов, 48 часов и 96 часов, или 48 часов и 72 часа, включительно, после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию завершают через, приблизительно через или в пределах 120 часов, 108 часов, 96 часов, 72 часов, 48 часов или 36 часов после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию завершают через 24 часов \pm 6 часов, 48 часов \pm 6 часов или 72 часов \pm 6 часов.

[0425] В некоторых вариантах осуществления, весь способ осуществляют с использованием одной популяции обогащенных Т-клеток, например, CD3+, CD4+ и CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, способ осуществляют с использованием двух или более входных популяций обогащенных Т-клеток, которые объединяют до и/или в ходе способа для получения или продукции одной выходной популяции обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, обогащенные Т-клетки представляют собой или включают модифицированные Т-клетки, например, Т-клетки, трансдуцированные для экспрессии рекомбинантного рецептора.

[0426] В некоторых вариантах осуществления, выходную популяцию, например, популяцию модифицированных Т-клеток, получают посредством (i) инкубации образца Т-

клеток или содержащего Т-клетки в стимулирующих условиях на хроматографической колонке (например, стимуляции на колонке) в течение менее чем 24 часов, (ii) введения гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в Т-клетки из стимулированной популяции, (iii) инкубации клеток, и затем (iv) сбора или накопления инкубированных клеток.

[0427] В конкретных вариантах осуществления, выходную популяцию, например, популяцию модифицированных Т-клеток, получают посредством (i) отбора и стимуляции Т-клеток с использованием хроматографии на колонке (например, стимуляции на колонке) за одну стадию и сбора спонтанно открепившихся клеток без использования конкурентного реагента менее чем за 24 часа, (ii) трансдукции стимулированных Т-клеток вирусным вектором, кодирующим рекомбинантный рецептор, например, посредством спинокуляции стимулированных Т-клеток в присутствии вирусного вектора, (iii) инкубации трансдуцированных Т-клеток в статических условиях в течение между или между 18 часов и 96 часов, включительно, и (iv) сбора Т-клеток из трансформированной популяции в пределах между точно или приблизительно 36 и 108 часов после начала инкубации в стимулирующих условиях.

[0428] В конкретных вариантах осуществления, выходную популяцию, например, популяцию модифицированных Т-клеток, получают посредством (i) отбора и стимуляции Т-клеток с использованием хроматографии на колонке (например, стимуляции на колонке) за одну стадию и сбора спонтанно открепившихся клеток без использования конкурентного реагента менее чем за или менее чем за приблизительно 6 часов, (ii) трансдукции стимулированных Т-клеток вирусным вектором, кодирующим рекомбинантный рецептор, в течение точно или приблизительно 1 час, (iii) инкубации трансдуцированных Т-клеток в течение точно или приблизительно 72 часов, и (iv) сбора Т-клеток из трансформированной популяции в пределах точно или приблизительно 90±10 часов после начала инкубации в стимулирующих условиях.

[0429] В некоторых вариантах осуществления, процесс, ассоциированный с представленными способами, сравнивают с альтернативным способом. Например, в некоторых вариантах осуществления, представленные в настоящем описании способы сравнивают с альтернативным способом, включающим стадию размножения клеток. В некоторых вариантах осуществления, альтернативный способ представляет собой способ, включающий отдельные стадии отбора и стимуляции клеток. В конкретных вариантах осуществления, альтернативный способ может отличаться в одном или нескольких конкретных аспектах, но в ином отношении включает сходные или одинаковые признаки, аспекты, ступени, стадии, реагенты и/или условия процесса, ассоциированного с представленными способами. В некоторых вариантах осуществления, альтернативный способ является сходным с процессом, ассоциированным с представленными способами, например, не содержит или не включает размножения, но отличается образом, который включает, но без ограничения, один или несколько из: включения отдельных стадий для отбора и стимуляции, различных реагентов и/или составов сред; присутствия сыворотки

во время инкубации, трансдукции, трансфекции и/или культивирования; различного клеточного состава входной популяции, например, соотношения CD4+ к CD8+ Т-клеток; различных стимулирующих условий и/или различного стимулирующего реагента; различного соотношения стимулирующего реагента к клеткам; различного вектора и/или способа трансдукции; различных расписания или порядка инкубации, трансдукции и/или трансфекции клеток; отсутствия или различия одного или нескольких рекомбинантных цитокинов, присутствующих во время инкубации или трансдукции (например, различных цитокинов или различных концентраций), или различного расписания сбора или накопления клеток.

[0430] В некоторых вариантах осуществления, длительность или количество времени, необходимые для завершения представленного способа, как измерено от выделения, обогащения, и/или отбора входных клеток (например, CD4+ или CD8+ Т-клеток) из биологического образца до момента времени, когда выходные клетки подвергаются сбору, составлению и/или криозащите, составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 48 часов, 72 часа, 96 часов, 120 часов, 4 суток, 5 суток, 7 суток или 10 суток. В некоторых вариантах осуществления, длительность или количество времени, необходимые для завершения представленного способа, как измерено от выделения, обогащения, и/или отбора входных клеток (например, CD4+ или CD8+ Т-клеток) из биологического образца до момента времени, когда выходные клетки подвергаются сбору, составлению и/или криозащите, составляет точно или приблизительно 4-5 суток. В некоторых вариантах осуществления, длительность или количество времени, необходимые для завершения представленного способа, как измерено от выделения, обогащения, и/или отбора входных клеток (например, CD4+ или CD8+ Т-клеток) из биологического образца до момента времени, когда выходные клетки подвергаются сбору, составлению и/или криозащите, составляет точно или приблизительно 5 суток. В некоторых вариантах осуществления, длительность или количество времени, необходимые для завершения представленного способа, как измерено от выделения, обогащения, и/или отбора входных клеток (например, CD4+ или CD8+ Т-клеток) из биологического образца до момента времени, когда выходные клетки подвергаются сбору, составлению и/или криозащите, составляет точно или приблизительно 4 суток. В некоторых вариантах осуществления, выделенные, отобранные или обогащенные клетки не подвергаются криозащите до стимуляции, и длительность или количество времени, необходимые для завершения представленного способа, как измерено от выделения, обогащения и/или отбора входных клеток (до момента времени, когда выходные клетки подвергаются сбору,

составлению и/или криозащите), составляет, составляет приблизительно или составляет менее чем 48 часов, 72 часа, 96 часов или 120 часов.

[0431] В конкретных вариантах осуществления, представленные способы осуществляют для популяции клеток, например, CD4+ и CD8+ Т-клеток или CD3+ Т-клеток, выделенных, обогащенных или отобранных из биологического образца. В некоторых аспектах, представленными способами можно продуцировать или получать композицию модифицированных Т-клеток от момента, когда биологический образец собирают от субъекта, за более короткий промежуток времени по сравнению с другими способами или процессами. В некоторых вариантах осуществления, представленными способами можно продуцировать или получать модифицированные Т-клетки, включая любые или все периоды времени, когда биологические образцы, или обогащенные, выделенные или отобранные клетки криоконсервируют и хранят до стадии трансдукции, в пределах точно или приблизительно 10 суток, 9 суток, 8 суток, 7 суток, 6 суток, 5 суток, или в пределах точно или приблизительно 120 часов, 96 часов, 72 часов или 48 часов, от момента, когда биологический образец собирают от субъекта, до момента, когда модифицированные Т-клетки накапливают, собирают, или составляют (например, для криоконсервации или введения). В некоторых вариантах осуществления, представленными способами можно продуцировать или получать модифицированные Т-клетки, включая любые или все периоды времени, когда биологические образцы, или обогащенные, выделенные или отобранные клетки криоконсервируют и хранят до стадии трансдукции, в пределах точно или приблизительно 5 суток или в пределах приблизительно 4 суток, от момента, когда биологический образец собирают от субъекта, до момента, когда модифицированные Т-клетки накапливают, собирают или составляют (например, для криоконсервации или введения).

[0432] В конкретных вариантах осуществления, представленные способы используют в сочетании со способом получения или продукции выходных клеток и/или выходных популяций обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, выходные клетки и/или выходные популяции обогащенных Т-клеток представляют собой или включают клетки, собранные, полученные, выделенные, отобранные и/или обогащенные из биологического образца, такого как образец крови или образец после лейкофереза; инкубированные в стимулирующих условиях; модифицированные, например, трансдуцированные, для экспрессии/или содержания рекомбинантного полинуклеотида, например, полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, такой как CAR; культивированные до порогового количества, плотности или размножения; и/или составленные. В некоторых вариантах осуществления, клетки из выходной популяции ранее подвергали криозащите и размораживанию, например, во время, до и/или после одной или нескольких стадий способа. В некоторых вариантах осуществления, выходная популяция (например, терапевтическая композиция клеток) содержит Т-клетки, например, CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, например, CAR.

[0433] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере 50% клеток выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%, из выходной композиции CD3+ Т-клеток (например, терапевтические композиция клеток) экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 50% из выходной композиции CD3+ Т-клеток экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или более чем 99% из выходной композиции CD4+ Т-клеток (например, терапевтической композиции клеток) экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере 50% из выходной композиции CD4+ Т-клеток (например, терапевтической композиции клеток) экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или более чем 99% из выходной композиции CD8+ Т-клеток (например, терапевтической композиции клеток) экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере 50% из выходной композиции CD8+ Т-клеток (например, терапевтической композиции клеток) экспрессируют рекомбинантный рецептор.

[0434] В конкретных вариантах осуществления, клетки из выходной композиции (например, терапевтической композиции клеток) имеют улучшенную цитолитическую активность по отношению к клеткам, экспрессирующим антиген, связываемый и/или узнаваемый рекомбинантным рецептором (например, клеткам-мишеням), по сравнению с выходными клетками, полученными альтернативным способом, например, способом, включающим одну или несколько стадий размножения клеток. В некоторых вариантах осуществления, когда клетки из выходной композиции (например, терапевтической

композиции клеток) подвергают воздействию клеток, экспрессирующих антиген, например, клеток-мишеней, клетки из выходной композиции уничтожают, уничтожают приблизительно или уничтожают по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% клеток, экспрессирующих антиген. В конкретных вариантах осуществления, клетки из выходной композиции (например, терапевтической композиции клеток) уничтожают по меньшей мере на 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, или в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза или 5 раз большее количество клеток, экспрессирующих антиген, например, клеток-мишеней, чем выходные клетки, полученные альтернативным способом в сходных или одинаковых условиях.

[0435] В конкретных вариантах осуществления, клетки из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) имеют улучшенную противоопухолевую активность *in vivo*, по сравнению с выходными клетками, полученными альтернативным способом, например, способом, включающим одну или несколько стадий размножения клеток. В некоторых вариантах осуществления, когда клетки из выходной композиции (например, терапевтической композиции клеток) вводят субъекту, например, субъекту, имеющему опухоль или злокачественную опухоль, клетки из выходной популяции уничтожают, уничтожают приблизительно, или уничтожают по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% клеток опухоли, например, клеток злокачественной опухоли или опухоли, экспрессирующих антиген, у субъекта. В конкретных вариантах осуществления, клетки из выходной композиции (например, терапевтической композиции клеток) уничтожают по меньшей мере на 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, или в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза или 5 раз большее количество клеток опухолей *in vivo*, чем выходные клетки, полученные альтернативным способом, в сходных или одинаковых условиях.

[0436] В конкретных вариантах осуществления, большинство клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) представляют собой подобные наивным клетки, центральные клетки памяти и/или эффекторные клетки памяти. В конкретных вариантах осуществления, большинство клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) представляют собой подобные наивным клетки или центральные клетки памяти. В некоторых вариантах осуществления, большинство клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) являются положительными по экспрессии одного или нескольких из CCR7 или CD27. В конкретных вариантах осуществления, клетки из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) имеют большую часть подобных наивным или центральных клеток памяти, чем выходные популяции, полученные альтернативными способами, такими как способы, включающие размножение.

[0437] В конкретных вариантах осуществления, клетки из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) имеют низкую долю и/или частоту клеток, которые являются истощенными и/или стареющими. В конкретных вариантах осуществления, клетки из выходной популяции имеют низкую долю и/или частоту клеток,

которые являются истощенными и/или стареющими. В некоторых вариантах осуществления, менее чем 40%, менее чем 35%, менее чем 30%, менее чем 25%, менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10%, менее чем 5%, или менее чем 1% клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) являются истощенными и/или стареющими. В конкретных вариантах осуществления, менее чем 25% клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) являются истощенными и/или стареющими. В конкретных вариантах осуществления, менее чем менее чем 10% клеток из выходной популяции являются истощенными и/или стареющими. В конкретных вариантах осуществления, клетки имеют низкую долю.

[0438] В некоторых вариантах осуществления, клетки из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) имеют низкую долю и/или частоту клеток, которые являются отрицательными по экспрессии CD27 и CCR7, например, поверхностной экспрессии. В конкретных вариантах осуществления, клетки из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) имеют низкую долю и/или частоту CD27- CCR7- клеток. В некоторых вариантах осуществления, менее чем 40%, менее чем 35%, менее чем 30%, менее чем 25%, менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10%, менее чем 5% или менее чем 1% клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) представляют собой CD27- CCR7- клетки. В конкретных вариантах осуществления, менее чем 25% клеток из выходной популяции представляют собой CD27- CCR7- клетки. В конкретных вариантах осуществления, менее чем менее чем 10% клеток из выходной популяции представляют собой CD27- CCR7- клетки. В некоторых вариантах осуществления, менее чем 5% клеток из выходной популяции представляют собой CD27- CCR7- клетки.

[0439] В некоторых вариантах осуществления, клетки из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) имеют высокую долю и/или частоту клеток, которые являются положительными по экспрессии одного или обоих из CD27 и CCR7, например, поверхностной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, клетки из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) имеют высокую долю и/или частоту клеток, которые являются положительными по одному или обоим из CD27 и CCR7. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток из выходной популяции являются положительными по одному или обоим из CD27 и CCR7. В различных вариантах осуществления, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% CD4+CAR+ клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) являются положительными по одному или обоим из CD27 и CCR7. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%,

по меньшей мере 95% или более чем 95% CD8+CAR+ клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) являются положительными по одному или обоим из CD27 и CCR7.

[0440] В конкретных вариантах осуществления, клетки из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) имеют высокую долю и/или частоту клеток, которые являются положительными по экспрессии CD27 и CCR7, например, поверхностной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, клетки из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) имеют высокую долю и/или частоту CD27+ CCR7+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) представляют собой CD27+ CCR7+ клетки. В различных вариантах осуществления, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% CD4+CAR+ клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) представляют собой CD27+ CCR7+ клетки. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более чем 95% CD8+CAR+ клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) представляют собой CD27+ CCR7+ клетки.

[0441] В конкретных вариантах осуществления, клетки из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) имеют низкую долю и/или частоту клеток, которые являются отрицательными по экспрессии CCR7 и положительными по экспрессии CD45RA, например, поверхностной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, клетки из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) имеют низкую долю и/или частоту CCR7-CD45RA+ клеток. В конкретных вариантах осуществления, менее чем 40%, менее чем 35%, менее чем 30%, менее чем 25%, менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10%, менее чем 5% или менее чем 1% клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) представляют собой CCR7-CD45RA+ клетки. В некоторых вариантах осуществления, менее чем 25% клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) представляют собой CCR7-CD45RA+ клетки. В конкретных вариантах осуществления, менее чем менее чем 10% клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) представляют собой CCR7-CD45RA+ клетки. В конкретных вариантах осуществления, менее чем 5% клеток из выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток) представляют собой CCR7-CD45RA+ клетки.

[0442] В любом из вариантов осуществления выше, стадию отбора (например, стадию окончательной очистки; см. раздел I-I) можно использовать для достижения доли,

частоты, концентрации и/или процента клеток конкретного фенотипа или функции в выходной популяции (например, терапевтической композиции клеток). В любом из вариантов осуществления выше, стадию отбора (например, стадию окончательной очистки; см. раздел I-I) можно использовать для отбора желательной популяции.

[0443] В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают до, приблизительно до или по меньшей мере до одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, восьми, десяти, двадцати или более удвоений клеток из популяции клеток, например, удвоений, происходящих во время инкубации. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают до любого удвоения популяции, например, удвоения, происходящего во время инкубации. В некоторых аспектах, уменьшение удвоений, которые могут происходить в ходе способа модификации, может, в некоторых вариантах осуществления, увеличивать долю модифицированных Т-клеток, принадлежащих к наивной линии. В некоторых вариантах осуществления, увеличение удвоений в ходе способа модификации увеличивает дифференцировку Т-клеток, которая может происходить в ходе способа модификации.

[0444] В некоторых аспектах, предусматривают, что для способа получения или продукции композиций модифицированных клеток (например, терапевтической композиции клеток), уменьшение размножения или удвоений клеток, происходящих в ходе способа, например, во время инкубации, увеличивает количество или долю подобных наивным Т-клеток из полученной композиции модифицированных клеток. В конкретных аспектах, увеличение размножения или удвоений клеток, происходящих в ходе способа, увеличивает количество или долю дифференцированных Т-клеток из полученной композиции модифицированных клеток. В некоторых аспектах, предусматривают, что способ, такой как способы, представленные в настоящем описании, повышающий или увеличивающий долю подобных наивным клеток в полученной композиции модифицированных клеток, может увеличивать активность, эффективность и персистенцию, например, *in vivo* после введения, композиции модифицированных клеток.

II. СРЕДСТВО И СИСТЕМЫ РЕАГЕНТОВ

[0445] В конкретных аспектах, в способах используют обратимые системы, в которых по меньшей мере одно средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) способное связывать молекулу на поверхности клетки (молекулу клеточной поверхности), является обратимо ассоциированным с реагентом (например, реагентом для отбора или стимулирующим реагентом). В некоторых случаях, реагент содержит множество участков связывания, способных обратимо связывать средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство). В некоторых случаях, реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент) представляет собой реагент для мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одно средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) содержит по меньшей мере один участок связывания В, который может специфически связывать эпитоп или область молекулы, а также содержит партнер по

связыванию С, которое специфически связывает по меньшей мере один участок связывания Z реагента (например, реагента для отбора или стимулирующего реагента). В некоторых случаях, взаимодействие связывания между партнером по связыванию С и по меньшей мере одним участком связывания Z представляет собой нековалентное 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 обратимым.

[0446] В некоторых вариантах осуществления, обратимая ассоциация может быть опосредовано присутствием вещества, такого как конкурентное средство или свободное связывающее средство, которое представляет собой или содержит участок связывания, который также является способным связывать по меньшей мере один участок связывания Z. Как правило, вещество (например, конкурентное средство или свободное связывающее средство) может действовать в качестве конкурента из-за более высокой аффинности связывания для участка связывания Z, присутствующего в реагенте, и/или из-за присутствия в более высоких концентрациях, чем партнер по связыванию С, таким образом, вызывая открепление и/или диссоциацию партнера по связыванию С от реагента. В некоторых вариантах осуществления, аффинность вещества (например, конкурентного средства или свободного связывающего средства) для по меньшей мере одного участка связывания Z больше, чем аффинность партнера по связыванию С средства (например, средства для отбора или стимулирующего средства) для по меньшей мере одного участка связывания Z. Таким образом, в некоторых случаях, связь между участком связывания Z реагента и партнера по связыванию С средства (например, средства для отбора или стимулирующего средства) можно разрушать посредством добавления вещества (например, конкурентного средства или свободного партнера по связыванию), таким образом, делая ассоциацию средства (например, средства для отбора или стимулирующего средства) и реагента (например, реагента для отбора или стимулирующего реагента) обратимой.

[0447] Реагенты, которые можно использовать в таких обратимых системах, описаны и известны в данной области, см., например, Патенты США No. 5168049; 5506121; 6103493; 7776562; 7981632; 8298782; 8735540; 9023604; и Публикации международных патентных заявок No. WO2013/124474 и WO2014/076277. Неограничивающие примеры реагентов и партнеров по связыванию, способных формировать обратимое взаимодействие, так же как веществ (например, конкурентных средств или свободных связывающих средств), способных обращать такое связывание, описаны ниже.

А. Реагент

[0448] Реагенты, предусмотренные в настоящем описании, включают реагенты для отбора и стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, реагенты для отбора и стимуляции являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления, реагенты для отбора и стимуляции являются различными. Однако, реагенты как для отбора, так и для

стимуляции, можно составлять из одинаковых материалов. В некоторых вариантах осуществления, реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент) содержит один или множество участков связывания Z, способных обратимо связывать партнер по связыванию С, содержащийся в средстве (например, средстве для отбора или стимулирующем средстве). В некоторых вариантах осуществления, реагент содержит множество участков связывания Z, каждый из которых способен специфически связывать партнер по связыванию С, включенный в средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), так что реагент является способным к обратимому связыванию множества средств (например, средства для отбора или стимулирующего средства), например, представляет собой реагент для мультимеризации (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент). В некоторых вариантах осуществления, реагент представляет собой олигомер или полимер из индивидуальных молекул (например, мономеров) или комплексов, составляющих индивидуальную молекулу (например, тетрамер), каждый из которых содержит по меньшей мере один участок связывания Z. В некоторых вариантах осуществления, реагент содержит по меньшей мере два участка связывания Z, по меньшей мере три участка связывания Z, по меньшей мере четыре участка связывания Z, например, по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72 или более участков связывания Z. Участки связывания все могут являться одинаковыми, или множество участков связывания могут содержать один или несколько различных участков связывания (например, Z1, Z2, Z3 и т.д.).

[0449] В некоторых вариантах осуществления, два или более средств (например, средств для отбора или стимулирующих средств) ассоциированы с, например, обратимо связаны с реагентом (например, реагентом для отбора или стимулирующим реагентом), например, посредством одного или множества участков связывания Z, присутствующих на реагенте (например, реагенте для отбора или стимулирующем реагенте). В некоторых случаях, это приводит к тому, что средства (например, средства для отбора или стимулирующие средства) расположены близко друг с другом, так что эффект avidности может иметь место, если клетку-мишень, имеющую (по меньшей мере две копии) молекулу клеточной поверхности, приводят в контакт с средством (например, средством для отбора или стимулирующим средством), имеющим один или несколько участков связывания В, способных связывать конкретную молекулу.

[0450] В некоторых вариантах осуществления, два или более различных средств (например, средств для отбора или стимулирующих средств), которые являются одинаковыми, т.е., содержащими одинаковый участок связывания В, могут обратимо связывать реагент. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать по меньшей мере два различных (вида) средств (например, средств для отбора или стимулирующих средств), и в некоторых случаях, три или четыре различных (вида) средств, например, два или более различных средств для отбора и/или стимулирующих средств. Например, в некоторых вариантах осуществления, реагент (например, реагент

для отбора или стимулирующий реагент) может обратимо связывать первое средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), содержащее участок связывания В1, В2, В3 или В4 и т.д., и второе средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), содержащее другой участок связывания, например, другой из участков связывания В1, В2, В3 или В4. В некоторых случаях, участок связывания первого средства и второго средства могут являться одинаковыми. Например, в некоторых аспектах, каждое из по меньшей мере двух средств (например, средств для отбора или стимулирующих средств) может связывать одинаковую молекулу. В некоторых случаях, участок связывания первого средства и второго средства могут являться различными. В некоторых аспектах, каждое из по меньшей мере двух средств (например, средств для отбора или стимулирующих средств) может связывать различную молекулу, такую как первая молекула, вторая молекула и т.д. В некоторых случаях, различные молекулы, такие как молекулы поверхности клетки, могут присутствовать на одной и той же клетке-мишени. В других случаях, различные молекулы, такие как молекулы поверхности клетки, могут присутствовать на различных клетках-мишенях, которые присутствуют в одной и той же популяции клеток. В некоторых случаях, третье, четвертое и т.д. средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) может являться ассоциированным с одним и тем же реагентом (например, реагентом для отбора или стимулирующим реагентом), где каждое содержит дополнительный отличный участок связывания.

[0451] В некоторых вариантах осуществления, два или более различных средств (например, средств для отбора или стимулирующих средств) содержат одинаковый партнер по связыванию С. В некоторых вариантах осуществления, два или более различных средств (например, средств для отбора или стимулирующих средств) содержат различные партнеры по связыванию. В некоторых аспектах, первое средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) может иметь партнера по связыванию С1, который может специфически связывать участок связывания Z1, присутствующий на реагенте (например, реагенте для отбора или стимулирующем реагенте), и второе средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) может иметь партнера по связыванию С2, который может специфически связывать участок связывания Z1 или участок связывания Z2, присутствующие на реагенте (например, реагенте для отбора или стимулирующем реагенте). Таким образом, в некоторых случаях, множество участков связывания Z, содержащихся в реагенте, включает участки связывания Z1 и Z2, которые являются способными к обратимому связыванию партнеров по связыванию С1 и С2, соответственно, содержащихся в средстве (например, средстве для отбора или стимулирующем средстве). В некоторых вариантах осуществления, С1 и С2 являются одинаковыми, и/или Z1 и Z2 являются одинаковыми. В других аспектах, один или несколько из множества участков связывания Z могут являться различными. В других случаях, один или несколько из множества партнеров по связыванию С могут являться различными. В пределах компетенции специалиста в данной области находится выбор

любой комбинации различных партнеров по связыванию С, которые являются совместимыми с реагентом, содержащим участки связывания Z, при условии, что каждый из партнеров по связыванию С является способным взаимодействовать, например, специфически связываться, с одним из участков связывания Z.

[0452] В некоторых вариантах осуществления, реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент) представляет собой стрептавидин, мутеин или аналог стрептавидина, авидин, мутеин или аналог авидина (такой как нейтравидин) или их смесь, в которых такой реагент содержит один или несколько участков связывания Z для обратимой ассоциации с партнером по связыванию С. В некоторых вариантах осуществления, партнер по связыванию С может представлять собой биотин, производное или аналог биотина, или связывающий стрептавидин пептид или другую молекулу, способную специфически связывать стрептавидин, мутеин или аналог стрептавидина, авидин или мутеин или аналог авидина. В некоторых вариантах осуществления, реагент представляет собой или содержит стрептавидин, авидин, аналог или мутеин стрептавидина, или аналог или мутеин авидина, который обратимо связывает биотин, аналог биотина или его биологически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент) представляет собой или содержит аналог или мутеин стрептавидина, или аналог или мутеин авидина, который обратимо связывает связывающий стрептавидин пептид. В некоторых вариантах осуществления, вещество (например, конкурентное средство или свободное связывающее средство) может представлять собой биотин, производное или аналог биотина или связывающий стрептавидин пептид, способные конкурировать за связывание с партнером по связыванию С за один или нескольких участков связывания Z. В некоторых вариантах осуществления, партнер по связыванию С и вещество (например, конкурентное средство или свободное связывающее средство) являются различными, и вещество (например, конкурентное средство или свободное связывающее средство) имеет более высокую аффинность связывания для одного или нескольких участков связывания Z по сравнению с аффинностью партнера по связыванию.

[0453] В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин может представлять собой стрептавидин дикого типа, мутеины или аналоги стрептавидина, такие как подобные стрептавидину полипептиды. Подобным образом, авидин, в некоторых аспектах, включает авидин дикого типа, или мутеины или аналоги авидина, такие как нейтравидин, дегликозилированный авидин с модифицированными остатками аргинина, который, как правило, имеет более нейтральный рН и является доступным в качестве альтернативы природному авидину. Как правило, дегликозилированные, нейтральные формы авидина включают, например, коммерчески доступные формы, такие как «экстревидин», доступный из Sigma Aldrich, или «нейтравидин», доступный из Thermo Scientific или Invitrogen.

[0454] В некоторых вариантах осуществления, реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент) представляет собой стрептавидин или мутеин или

аналог стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин дикого типа (wt-стрептавидин) имеет аминокислотную последовательность, описанную в Argarana et al, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 1871-1882 (SEQ ID NO: 1). Как правило, стрептавидин в природе встречается в форме тетрамера из четырех идентичных субъединиц, *m.e.* он представляет собой гомотетрамер, где каждая субъединица содержит один участок связывания для биотина, производного или аналога биотина, или миметика биотина. Иллюстративная последовательность субъединицы стрептавидина представляет собой последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 1, но такая последовательность может также включать последовательность, присутствующую в ее гомологах из других видов *Streptomyces*. В частности, каждая субъединица стрептавидина может иметь сильную аффинность связывания для биотина с равновесной константой диссоциации (K_D) порядка приблизительно 10^{-14} М. В некоторых случаях, стрептавидин может существовать в форме одновалентного тетрамера, в котором только один из четырех участков связывания является функциональным (Howarth et al. (2006) *Nat. Methods*, 3:267-73; Zhang et al. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 463:1059-63)), двухвалентного тетрамера, в котором два из четырех участков связывания являются функциональными (Fairhead et al. (2013) *J. Mol. Biol.*, 426:199-214), или могут присутствовать в мономерной или димерной форме (Wu et al. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280:23225-31; Lim et al. (2010) *Biochemistry*, 50:8682-91).

[0455] В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин может находиться в любой форме, такой как стрептавидин дикого типа или немодифицированный стрептавидин, такой как стрептавидин из видов *Streptomyces* или его функционально активный фрагмент, который включает по меньшей мере одну функциональную субъединицу, содержащую участок связывания для биотина, производного или аналога биотина, или миметика биотина, например, как правило, содержит по меньшей мере одну функциональную субъединицу стрептавидина дикого типа из *Streptomyces avidinii*, указанную в SEQ ID NO: 1, или ее функционально активный фрагмент. Например, в некоторых вариантах осуществления, стрептавидин может включать фрагмент стрептавидина дикого типа, который является укороченным с N- и/или C-конца. Такие минимальные стрептавидины включают любой, который начинается с N-конца в области положений аминокислот 10-16 из SEQ ID NO: 1 и заканчивается с C-конца в области положений аминокислот 133-142 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, функционально активный фрагмент стрептавидина содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, функционально активный фрагмент стрептавидина содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 103. В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин, такой, как указано в SEQ ID NO: 2, может дополнительно содержать N-концевой метионин в положении, соответствующем Ala13, с нумерацией, указанной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, функционально активный фрагмент стрептавидина, такой, как указано в SEQ ID NO: 103, не имеет N-

концевого метионина в положении, соответствующем Ala13, с нумерацией, указанной в SEQ ID NO: 1. Ссылка на положение остатков в стрептавидине или мутеинах стрептавидина приведена со ссылкой на нумерацию остатков в SEQ ID NO: 1.

[0456] В некоторых аспектах, мутеины стрептавидина включают полипептиды, которые отличаются от последовательности немодифицированного стрептавидина или стрептавидина дикого типа одной или несколькими заменами, делециями или добавлениями аминокислот, но которые включают по меньшей мере одну функциональную субъединицу, содержащую участок связывания для биотина, производного или аналога биотина, или связывающего стрептавидин пептида. В некоторых аспектах, подобные стрептавидину полипептиды и мутеины стрептавидина могут представлять собой полипептиды, которые по существу являются иммунологически эквивалентными стрептавидину дикого типа и являются, в частности, способными связывать биотин, производные биотина или аналоги биотина с такой же или отличной аффинностью от wt-стрептавидина. В некоторых случаях, подобные стрептавидину полипептиды или мутеины стрептавидина могут содержать аминокислоты, которые не являются частью стрептавидина дикого типа, или они могут включать только часть стрептавидина дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, подобные стрептавидину полипептиды представляют собой полипептиды, которые не являются идентичными стрептавидину дикого типа, поскольку хозяин не имеет ферменты, необходимые для трансформации продуцированного хозяином полипептида в структуру стрептавидина дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин также может присутствовать в форме тетрамеров стрептавидина и димеров стрептавидина, в частности, гомотетрамеров стрептавидина, гомодимеров стрептавидина, гетеротетрамеров стрептавидина и гетеродимеров стрептавидина. Как правило, каждая субъединица в норме имеет участок связывания для биотина или аналогов биотина, или для связывающих стрептавидин пептидов. Примеры видов стрептавидина или мутеинов стрептавидина упомянуты, например, в WO 86/02077, DE 19641876 A1, US 6022951, WO 98/40396 или WO 96/24606.

[0457] В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина может содержать аминокислоты, которые не являются частью немодифицированного стрептавидина или стрептавидина дикого типа, или могут включать только часть стрептавидина дикого типа или немодифицированного стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит по меньшей мере одну субъединицу, которая может иметь одну или несколько замещений (замен) аминокислот, по сравнению с субъединицей немодифицированного стрептавидина или стрептавидина дикого типа, например, по сравнению с субъединицей стрептавидина дикого типа, указанной в SEQ ID NO: 1, или ее функционально активным фрагментом, например, указанным в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO:103. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна субъединица мутеина стрептавидина может иметь по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 отличий аминокислот,

по сравнению со стрептавидином дикого типа или немодифицированным стрептавидином, и/или содержит по меньшей мере одну субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 1, 2 или 103, где такой мутеин стрептавидина имеет функциональную активность для связывания биотина, производного или аналога биотина, или миметика биотина. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные замены (замещения) представляют собой консервативные или неконсервативные мутации. Примеры мутеинов стрептавидина известны в данной области, см., например, Патент США No. 5168049; 5506121; 6022951; 6156493; 6165750; 6103493; или 6368813; или Публикацию международной патентной заявки PCT No. WO2014/076277.

[0458] В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин или мутеин стрептавидина включает белки, содержащие одну или более одной функциональной субъединицы, содержащей один или несколько участков связывания Z для биотина, производного или аналога биотина, или связывающего стрептавидин пептида, например, две или более, три или более, четыре или более, и, в некоторых случаях, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более функциональных субъединиц. В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин или мутеин стрептавидина могут включать мономер; димер, включая гетеродимер или гомодимер; тетрамер, включая гомотетрамер, гетеротетрамер, одновалентный тетрамер или двухвалентный тетрамер; или могут включать мультимеры более высокого порядка или их олигомеры.

[0459] В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания стрептавидина или мутеина стрептавидина для пептидного лиганда - партнера по связыванию, составляет менее чем 1×10^{-4} М, 5×10^{-4} М, 1×10^{-5} М, 5×10^{-5} М, 1×10^{-6} М, 5×10^{-6} М или 1×10^{-7} М, но, как правило, более чем 1×10^{-13} М, 1×10^{-12} М или 1×10^{-11} М. Например, пептидные последовательности (Strep-метки), такие как описано в Патенте США No. 5506121, могут действовать в качестве миметиков биотина и иметь аффинность связывания для стрептавидина, например, с K_D приблизительно между 10^{-4} М и 10^{-5} М. В некоторых случаях, аффинность связывания можно дополнительно улучшать посредством внесения мутации в пределах молекулы стрептавидина, см., например, Патент США No. 6103493 или Публикацию международной патентной заявки PCT No. WO2014/076277. В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания можно определять способами, известными в данной области, такими как любые, описанные ниже.

[0460] В некоторых вариантах осуществления, реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент), такой как стрептавидин или мутеин стрептавидина, имеет аффинность связывания для пептидного лиганда - партнера по связыванию, где пептидный лиганд - партнер по связыванию может представлять собой партнер по связыванию С, присутствующий в средстве (например, средстве для отбора или стимулирующем средстве). В некоторых вариантах осуществления, пептидная

последовательность содержит последовательность с общей формулой, указанной в SEQ ID NO: 9, например, содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность имеет общую формулу, указанную в SEQ ID NO: 11, такую, как указано в SEQ ID NO: 12. В одном примере, пептидная последовательность представляет собой Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (также называемую Strep-меткой®, указанной в SEQ ID NO: 7). В одном примере, пептидная последовательность представляет собой Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (также называемую Strep-меткой® II, указанной в SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд содержит последовательную аранжировку по меньшей мере двух связывающих стрептавидин модулей, где расстояние между двумя модулями составляет по меньшей мере 0 и не более чем 50 аминокислот, где один связывающий модуль имеет 3-8 аминокислот и содержит по меньшей мере последовательность His-Pro-Хаа (SEQ ID NO: 9), где Хаа представляет собой глутамин, аспарагин или метионин, и где другой связывающий модуль имеет такой же или отличный пептидный лиганд стрептавидина, такой, как указано в SEQ ID NO: 11 (см., например, Публикацию международной патентной заявки PCT No. WO02/077018; Патент США No. 7981632). В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд содержит последовательность, имеющую формулу, указанную в любой из SEQ ID NO: 13 или 14. В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд имеет последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 15-19.

[0461] В некоторых вариантах осуществления, реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент) представляет собой или содержит мутеин стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, мутеины стрептавидина содержат одну или несколько мутаций (например, замен аминокислот) по сравнению со стрептавидином дикого типа, указанным в SEQ ID NO: 1 или его биологически активной частью (например, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:103). Например, биологически активные части стрептавидина могут включать варианты стрептавидина, которые являются укороченными с N- и/или C-конца, которые, в некоторых случаях называют минимальным стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления, укороченный с N-конца минимальный стрептавидин, в который может быть внесена любая из мутаций, начинается с N-конца в области положений аминокислот 10-16 и заканчивается с C-конца в области положений аминокислот 133-142, по сравнению с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, укороченный с N-конца стрептавидин, в который может быть внесена любая из мутаций, содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, минимальный стрептавидин содержит аминокислотную последовательность от положения Ala13 до Ser139 и необязательно имеет N-концевой остаток метионина вместо Ala13. Для целей по настоящему изобретению, нумерация положений аминокислот имеет сквозную нумерацию по wt-стрептавидину, указанному в

SEQ ID NO: 1 (например, Argarana et al., *Nucleic Acids Res.* 14 (1986), 1871 -1882, ср. также фиг. 3).

[0462] В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина представляет собой мутант, как описано в Патенте США No. 6103493. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит по меньшей мере одну мутацию в пределах области положений аминокислот 44-53, на основании аминокислотной последовательности стрептавидина дикого типа, такой, как указано в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит мутацию в одном или нескольких остатках 44, 45, 46 и/или 47. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит замену Glu в положении 44 стрептавидина дикого типа на гидрофобную алифатическую аминокислоту, например, Val, Ala, Ile или Leu, любую аминокислоту в положении 45, алифатическую аминокислоту, такую как гидрофобная алифатическая аминокислота, в положении 46 и/или замену Val в положении 47 на основную аминокислоту, например, Arg или Lys, например, как правило, Arg. В некоторых вариантах осуществления, Ala находится в положении 46, и/или Arg находится в положении 47, и/или Val или Ile находится в положении 44. В некоторых вариантах осуществления, мутант стрептавидина содержит остатки Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷, такие, как указано в иллюстративных мутеинах стрептавидина, содержащих последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 (также известную как мутант 1 стрептавидина, SAM1) или SEQ ID NO:104. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит остатки Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷, такие, как указано в иллюстративных мутеинах стрептавидина, содержащих последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, (также известную как SAM2) или SEQ ID NO:105. В некоторых случаях, такие мутеины стрептавидина описаны, например, в Патенте США 6103493, и являются коммерчески доступными под торговым наименованием Strep-Tactin®.

[0463] В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина представляет собой мутант, как описано в Публикации международной патентной заявки No. WO 2014/076277. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит по меньшей мере два остатка цистеина в области положений аминокислот 44-53, со ссылкой на положения аминокислот, указанные в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, остатки цистеина присутствуют в положениях 45 и 52 для получения дисульфидного мостика, соединяющего эти аминокислоты. В таком варианте осуществления, аминокислота 44 представляет собой, как правило, глицин или аланин, и аминокислота 46 представляет собой, как правило, аланин или глицин, и аминокислота 47 представляет собой, как правило, аргинин. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит по меньшей мере одну мутацию или замену аминокислоты в области аминокислотных остатков 115-121, со ссылкой на положения аминокислот, указанные в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит по меньшей мере одну мутацию в положении аминокислоты 117, 120 и 121,

и/или делецию аминокислот 118 и 119, и замену по меньшей мере положения аминокислоты 121.

[0464] В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит мутацию в положении, соответствующем положению 117, где мутацию можно осуществлять до большого гидрофобного остатка, подобного Trp, Tyr или Phe, или заряженного остатка, подобного Glu, Asp или Arg, или гидрофильного остатка, подобного Asn или Gln, или, в некоторых случаях, гидрофобных остатков Leu, Met или Ala, или полярных остатков Thr, Ser или His. В некоторых вариантах осуществления, мутацию в положении 117 комбинируют с мутацией в положении, соответствующем положению 120, где мутацию можно осуществлять до малого остатка, подобного Ser или Ala или Gly, и мутацией в положении, соответствующем положению 121, где мутацию можно осуществлять до гидрофобного остатка, такого как объемный гидрофобный остаток, подобный Trp, Tyr или Phe. В некоторых вариантах осуществления, мутацию в положении 117 комбинируют с мутацией в положении, соответствующем положению 120 стрептавидина дикого типа, указанного в SEQ ID NO:1, или его биологически активного фрагмента, где мутация может представлять собой гидрофобный остаток, такой как Leu, Ile, Met или Val или, как правило, Tyr или Phe, и мутацией в положении, соответствующем положению 121, по сравнению с положениями стрептавидина дикого типа, указанного в SEQ ID NO:1, или его биологически активного фрагмента, где мутацию можно осуществлять до малого остатка, подобного Gly, Ala или Ser, или с Gln, или с гидрофобным остатком, подобным Leu, Val, Ile, Trp, Tyr, Phe или Met. В некоторых вариантах осуществления, такие мутеины также могут содержать остатки Val44-Thr45-Ala46-Arg47 или остатки Ile44-Gly45-Ala46-Arg47. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит остатки Val44, Thr45, Ala46, Arg47, Glu117, Gly120 и Tyr121. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:27 или SEQ ID NO:28, или последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28, содержит остатки Val44, Thr45, Ala46, Arg47, Glu117, Gly120 и Tyr121, и имеет функциональную активность для связывания биотина, аналога биотина или связывающего стрептавидин пептида.

[0465] В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина может содержать любую из вышеуказанных мутаций в любой комбинации, и полученный мутеин стрептавидина может иметь аффинность связывания, составляющую менее чем $2,7 \times 10^{-4}$ М для пептидного лиганда (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; также называемого Strep-меткой®, указанной в SEQ ID NO: 7) и/или менее чем $1,4 \times 10^{-4}$ М для пептидного лиганда (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; также называемого Strep-меткой® II, указанной в SEQ ID NO: 8) и/или составляет менее чем 1×10^{-4} М, 5×10^{-4} М, 1×10^{-5} М, 5×10^{-5} М, 1×10^{-6}

М, 5×10^{-6} М или 1×10^{-7} М, но, как правило, более чем 1×10^{-13} М, 1×10^{-12} М или 1×10^{-11} М, для любого из пептидных лигандов, указанных в любой из SEQ ID NO:7-19.

[0466] В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина имеет последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 104 или 105, или последовательность аминокислот, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью аминокислот, указанной в любой из SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 104 или 105, и имеет аффинность связывания, составляющую менее чем $2,7 \times 10^{-4}$ М для пептидного лиганда (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; также называемую Strep-метку®, указанной в SEQ ID NO: 7) и/или менее чем $1,4 \times 10^{-4}$ М для пептидного лиганда (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; также называемого Strep-меткой® II, указанной в SEQ ID NO: 8) и/или составляющую менее чем 1×10^{-4} М, 5×10^{-4} М, 1×10^{-5} М, 5×10^{-5} М, 1×10^{-6} М, 5×10^{-6} М или 1×10^{-7} М, но, как правило, более чем 1×10^{-13} М, 1×10^{-12} М или 1×10^{-11} М, для любого из пептидных лигандов, указанных в любой из SEQ ID NO:7-19.

[0467] В некоторых вариантах осуществления, для мутеина стрептавидина также показано связывание с другими лигандами стрептавидина, такими как, но без ограничения, биотин, иминобиотин, липоевая кислота, дестиобиотин, диаминобиотин, НАВА (гидроксиазобензол-бензойная кислота) и/или диметил-НАВА. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина имеет аффинность связывания для другого лиганда стрептавидина, такого как биотин или дестиобиотин, превышающую аффинность связывания мутеина стрептавидина для имитирующего биотин пептидного лиганда, такого, как указано в любой из SEQ ID NO: 7-19. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, биотин или аналог или производное биотина (например, дестиобиотин) можно использовать в качестве конкурентного средства в представленных способах. Например, в качестве примера, взаимодействие мутеина стрептавидина, называемого Strep-tactin® (например, содержащего последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4), с пептидным лигандом, называемым Strep-меткой® II (например, указанным в SEQ ID NO: 8), характеризуется аффинностью связывания с K_D приблизительно 10^{-6} М, по сравнению с приблизительно 10^{-13} М для взаимодействия биотин-стрептавидин. В некоторых случаях, биотин, который может связываться с высокой аффинностью Strep-tactin® с K_D между точно или приблизительно 10^{-10} и 10^{-13} М, может конкурировать с Strep-меткой® II за участок связывания.

[0468] В некоторых случаях, реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент) содержит по меньшей мере две хелатирующие группы К, которые могут являться способными связывать ион переходного металла. В некоторых вариантах осуществления, реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент) может являться способными связывать олигогистидиновую аффинную метку, глутатион-S-трансферазу, кальмодулин или его аналог, связывающий кальмодулин пептид (CBP), FLAG-пептид, НА-метку, связывающий мальтозу белок (MBP), эпитоп HSV, эпитоп тус и/или биотинилированный белок-носитель.

[0469] В некоторых вариантах осуществления, реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент) представляет собой олигомер или полимер. В некоторых вариантах осуществления, олигомер или полимер можно получать посредством связывания, напрямую или опосредованно, индивидуальных молекул белка, как он существует в природе, посредством связывания, напрямую или опосредованно, либо индивидуальных молекул мономера, либо комплекса субъединиц, составляющих индивидуальную молекулу (например, связывания, напрямую или опосредованно, димеров, тримеров, тетрамеров и т.д. белка, как он существует в природе). Например, тетрамерный гомодимер или гетеродимер стрептавидина или авидина может быть обозначен как индивидуальная молекула или наименьший строительный блок соответствующего олигомера или полимера. В некоторых вариантах осуществления, олигомер или полимер может содержать связь по меньшей мере 2 индивидуальных молекул белка (например, представляет собой 2-членник), или может представлять собой по меньшей мере 3-членник, 4-членник, 5-членник, 6-членник, 7-членник, 8-членник, 9-членник, 10-членник, 11-членник, 12-членник, 13-членник, 14-членник, 15-членник, 16-членник, 17-членник, 18-членник, 19-членник, 20-членник, 25-членник, 30-членник, 35-членник, 40-членник, 45-членник или 50-членник из индивидуальных молекул белка (например, мономеров, тетрамеров).

[0470] Олигомеры можно получать с использованием любых способов, известных в данной области, таких как любые, описанные в Публикации патентной заявки США No. US2004/0082012. В некоторых вариантах осуществления, олигомер или полимер содержит две или более индивидуальные молекулы, которые могут являться перекрестно сшитыми, например, посредством полисахарида или бифункционального линкера.

[0471] В некоторых вариантах осуществления, олигомер или полимер получают посредством перекрестного сшивания индивидуальных молекул или комплекса субъединиц, составляющих индивидуальную молекулу, в присутствии полисахарида. В некоторых вариантах осуществления, олигомеры или полимеры можно получать посредством введения карбоксильных остатков в полисахарид, например, декстран. В некоторых аспектах, индивидуальные молекулы реагента (например, момеры, тетрамеры) можно связывать посредством первичных аминогрупп внутренних остатков лизина и/или свободного N-конца с карбоксильными группами в декстрановом остове с использованием общепринятых карбодиимидных химических реакций. В некоторых вариантах осуществления, реакцию связывания проводят в молярном соотношении приблизительно 60 моль индивидуальных молекул реагента (например, мономеров, тетрамеров) на моль декстрана.

[0472] В некоторых вариантах осуществления, реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент) представляет собой олигомер или полимер из одного или нескольких из стрептавидина или авидина, или любого аналога или мутеина стрептавидина (например, Strep-Tactin® или Strep-Tactin® XT), или аналога или мутеина авидина (например, нейтрэвидина). В некоторых вариантах осуществления, участок

связывания Z представляет собой природный связывающий биотин участок авидина или стрептавидина, для которого может присутствовать вплоть до четырех участков связывания в индивидуальной молекуле (например, тетрамер содержит четыре участка связывания Z), при этом гомотетрамер может содержать вплоть до 4 участков связывания, которые являются одинаковыми, *т.е.* Z1, в то время как гетеротетрамер может содержать вплоть до 4 участков связывания, которые могут являться различными, например, содержащими Z1 и Z2. В некоторых вариантах осуществления, олигомер образован или получен из множества индивидуальных молекул (например, множества гомотетрамеров) одинакового стрептавидина, мутеина стрептавидина, авидина или мутеина авидина, в этом случае, каждый участок связывания Z, например, Z1, олигомера является одинаковым. Например, в некоторых случаях, олигомер может содержать множество участков связывания Z1, например, по меньшей мере 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, 40, 45, 50 или более участков связывания Z1. В некоторых вариантах осуществления, олигомер образован или получен из множества индивидуальных молекул, которые могут представлять собой гетеротетрамеры стрептавидина, мутеина стрептавидина, авидина или мутеина авидина, и/или из множества из двух или более различных индивидуальных молекул (например, различных гомотетрамеров) стрептавидина, мутеина стрептавидина, авидина или мутеина авидина, отличающихся своими участками связывания Z, например, Z1 и Z2, в этом случае, множество различных участков связывания Z, например, Z1 и Z2, могут присутствовать в олигомере. Например, в некоторых случаях, олигомер может содержать множество участков связывания Z1 и множество участков связывания Z, которые, в комбинации, могут включать по меньшей мере 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, 40, 45, 50 или более объединенных участков связывания Z1 и Z2.

[0473] В некоторых случаях, соответствующий олигомер или полимер может являться перекрестно сшитым посредством полисахарида. В одном варианте осуществления, олигомеры или полимеры стрептавидина или авидина, или аналогов стрептавидина или авидина (например, нейтралавина) можно получать посредством введения карбоксильных остатков в полисахарид, например, декстран, в основном, как описано в Noguchi, A, et al, *Bioconjugate Chemistry* (1992) 3,132-137, на первой стадии. В некоторых таких аспектах, стрептавидин или авидин, или их аналоги затем можно связывать посредством первичных аминогрупп внутренних остатков лизина и/или свободного N-конца с карбоксильными группами в декстрановом остове с использованием общепринятых карбодиимидных химических реакций, на второй стадии. В некоторых случаях, перекрестно сшитые олигомеры или полимеры стрептавидина или авидина, или любого аналога стрептавидина или авидина, можно также получать посредством перекрестного сшивания посредством бифункциональных молекул, служащих в качестве линкера, таких как глутардиальдегид, или посредством других способов, описанных в данной области.

[0474] В некоторых вариантах осуществления, олигомер или полимер получают посредством перекрестного сшивания индивидуальных молекул или комплекса субъединиц, составляющих индивидуальную молекулу, с использованием бифункционального линкера или другого химического линкера, такого как глутардиальдегид, или посредством других способов, известных в данной области. В некоторых аспектах, перекрестно сшитые олигомеры или полимеры стрептавидина или авидина, или любого мутеина или аналога стрептавидина или авидина можно получать посредством перекрестного сшивания индивидуальных молекул стрептавидина или авидина посредством бифункциональных молекул, служащих в качестве линкера, таких как глутардиальдегид или посредством других способов, описанных в данной области. Является, например, возможным получать олигомеры мутеинов стрептавидина посредством введения тиоловых групп в мутеин стрептавидина (это можно, например, осуществлять посредством реакции мутеина стрептавидина с 2-иминотиолоном (реагентом Трота) и посредством активации, например, в отдельной реакции, аминокислотных групп, доступных в мутеине стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, эту активацию аминокислотных групп можно осуществлять посредством реакции мутеина стрептавидина с коммерчески доступным гетеробифункциональным сшивающим средством, таким как сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) или сукцинимидил-6-[(β-малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH). В некоторых таких вариантах осуществления, два полученных таким образом продукта реакции смешивают вместе, что, как правило, приводит к реакции тиоловых групп, содержащихся в одной партии модифицированного мутеина стрептавидина, с активированными (например, посредством малеинимидных функциональных групп) аминокислотами из другой партии модифицированного мутеина стрептавидина. В некоторых случаях, посредством этой реакции, образуются мультимеры/олигомеры мутеина стрептавидина. Эти олигомеры могут иметь любое подходящее количество индивидуальных молекул, например, по меньшей мере 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, 40, 45, 50 или более, и степень олигомеризации может меняться в зависимости от условий реакции.

[0475] В некоторых вариантах осуществления, олигомерный или полимерный реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент) можно выделять посредством эксклюзионной хроматографии, и любую желательную фракцию можно использовать в качестве реагента. Например, в некоторых вариантах осуществления, после реакции модифицированного мутеина стрептавидина, в присутствии 2-иминотиолана и гетеробифункционального сшивающего средства, такого как сульфос-SMCC, олигомерный или полимерный реагент можно выделять посредством эксклюзионной хроматографии, и любую желательную фракцию можно использовать в качестве реагента. В некоторых вариантах осуществления, олигомеры не имеют (и не должны иметь) одну молекулярную массу, но для них можно наблюдать статистическое распределение по массе, такое как распределение Гаусса. В некоторых случаях, любой

олигомер, имеющий более трех тетрамеров стрептавидина или мутеина, например, гомотетрамеров или гетеротетрамеров, можно использовать в качестве растворимого реагента, например, как правило, 3-50 тетрамеров, например, гомотетрамеров или гетеротетрамеров, 10-40 тетрамеров, например, гомотетрамеров или гетеротетрамеров, или 25-35 тетрамеров, например, гомотетрамеров или гетеротетрамеров. Олигомеры могут иметь, например, от 3 до 25 тетрамеров мутеина стрептавидина, например, гомотетрамеров или гетеротетрамеров. В некоторых аспектах, при молекулярной массе приблизительно 50 кДа в случае мутеинов стрептавидина, растворимые олигомеры могут иметь молекулярную массу от приблизительно 150 кДа до приблизительно 2000 кДа, от приблизительно 150 кДа до приблизительно 1500 кДа, от приблизительно 150 кДа до приблизительно 1250 кДа, от приблизительно 150 кДа до 1000 кДа, от приблизительно 150 кДа до приблизительно 500 кДа или от приблизительно 150 кДа до приблизительно 300 кДа, от приблизительно 300 кДа до приблизительно 2000 кДа, от приблизительно 300 кДа до приблизительно 1500 кДа, от приблизительно 300 кДа до приблизительно 1250 кДа, от приблизительно 300 кДа до 1000 кДа, от приблизительно 300 кДа до приблизительно 500 кДа, от приблизительно 500 кДа до приблизительно 2000 кДа, от приблизительно 500 кДа до приблизительно 1500 кДа, от приблизительно 500 кДа до приблизительно 1250 кДа, от приблизительно 500 кДа до 1000 кДа, от приблизительно 1000 кДа до приблизительно 2000 кДа, от приблизительно 1000 кДа до приблизительно 1500 кДа, от приблизительно 1000 кДа до приблизительно 1250 кДа, от приблизительно 1250 кДа до приблизительно 2000 кДа или от приблизительно 1500 кДа до приблизительно 2000 кДа. Как правило, поскольку каждая молекула/мутеин стрептавидина имеет четыре участка связывания биотина, такой реагент может обеспечивать 12-160 участков связывания Z, например, 12-100 участков связывания Z.

В. Средства

[0476] Средства, предусмотренные по настоящему изобретению, включают средства для отбора и стимулирующие средства. В некоторых вариантах осуществления, средства для отбора и стимулирующие средства являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления, средства для отбора и стимулирующие средства являются различными. Однако, реагенты как для отбора, так и для стимуляции, можно составлять из одинаковых материалов. В некоторых вариантах осуществления, средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) имеет один или несколько участков связывания, В, для связывания молекулы на поверхности клетки, например, молекулы клеточной поверхности. Таким образом, в некоторых случаях, средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) содержит участок связывания В или множество участков связывания В, где специфическое связывание между средством (например, средством для отбора или стимулирующим средством) и молекулой на поверхности клеток-мишеней включает взаимодействие между В и молекулой. В некоторых вариантах осуществления, средство содержит только один участок связывания, т.е., является одновалентным. В некоторых вариантах осуществления, средство

(например, средство для отбора или стимулирующее средство) имеет по меньшей мере два, например, множество участков связывания В, включая три, четыре или пять участков связывания В, способных связывать молекулу клеточной поверхности. В некоторых таких аспектах, по меньшей мере два или множество участков связывания В могут являться идентичными. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько из по меньшей мере двух или множества участков связывания В могут являться различными (например, В1 и В2).

[0477] В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько различных средств (например, одно или несколько различных средств, например, средство для отбора или стимулирующее средство, или другое средство, которое связывает молекулу на клетке) обратимо связано с реагентом (например, средством для отбора или стимулирующим реагентом). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 2, 3, 4 или более различных средств (например, средств для отбора или стимулирующих средств) обратимо связаны с одним и тем же реагентом. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере два различных средства (например, средство для отбора или стимулирующие средства) обратимо связаны с одним и тем же реагентом, при этом каждое средство содержит участок связывания В или множество участков связывания В для специфического связывания между средством и молекулой. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере два или более средств (например, средств для отбора или стимулирующих средств) содержат одинаковый участок связывания В, например, для связывания одинаковой или по существу одинаковой молекулы. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере два или более средств (например, средств для отбора или стимулирующих средств) содержат различных участки связывания В, например, для связывания различных молекул. В некоторых вариантах осуществления, первое средство (например, первое средство для отбора или первое стимулирующее средство) содержит участок связывания В1, В2, В3, В4 и т.д., и второе средство (например, второе средство для отбора или второе стимулирующее средство) содержит другой из участков связывания В1, В2, В3, В4 и т.д. В некоторых вариантах осуществления, первое средство (например, первое средство для отбора) содержит участок связывания В1, и второе средство (например, второе средство для отбора) содержит участок связывания В3. В некоторых вариантах осуществления, первое средство (например, первое стимулирующее средство) содержит участок связывания В2, и второе средство (например, второе стимулирующее средство) содержит участок связывания В4. В любом из таких вариантов осуществления, первое средство и второе средство могут содержать партнер по связыванию, С1 или С2. В некоторых вариантах осуществления, С1 и С2 могут являться одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления, С1 и С2 являются различными. В некоторых вариантах осуществления, первое средство и второе средство содержат одинаковый партнер по связыванию, С1.

[0478] В некоторых случаях, константа диссоциации (K_D) для связывания между средством (например, посредством участка связывания В) и участком связывания Z

реагента может иметь значение в диапазоне от приблизительно 10^{-2} М до приблизительно 10^{-13} М или от приблизительно 10^{-3} М до приблизительно 10^{-12} М, или от приблизительно 10^{-4} М до приблизительно 10^{-11} М, или от приблизительно 10^{-5} М до приблизительно 10^{-10} М. В некоторых вариантах осуществления, константа диссоциации (K_D) для связывания между связывающим средством и молекулой соответствует низкой аффинности, например, в диапазоне K_D от приблизительно 10^{-3} до приблизительно 10^{-7} М. В некоторых вариантах осуществления, константа диссоциации (K_D) для связывания между связывающим средством и молекулой соответствует высокой аффинности, например, в диапазоне K_D от приблизительно 10^{-7} до приблизительно 1×10^{-10} М.

[0479] В некоторых вариантах осуществления, диссоциация связывания средства посредством участка связывания В и молекулы происходит достаточно быстро, например, чтобы позволить только временное окрашивание или ассоциацию со средством клетки-мишени после разрушения обратимой связи между реагентом и средством. В некоторых случаях, при выражении в отношении значения k_{off} (также называемой константой скорости диссоциации для связывания между средством (посредством участка связывания В) и молекулой, значение k_{off} составляет приблизительно $0,5 \times 10^{-4}$ с⁻¹ или более, приблизительно 1×10^{-4} с⁻¹ или более, приблизительно 2×10^{-4} с⁻¹ или более, приблизительно 3×10^{-4} с⁻¹ или более, приблизительно 4×10^{-4} с⁻¹ или более, приблизительно 5×10^{-4} с⁻¹ или более, приблизительно 1×10^{-3} с⁻¹ или более, приблизительно $1,5 \times 10^{-3}$ с⁻¹ или более, приблизительно 2×10^{-3} с⁻¹ или более, приблизительно 3×10^{-3} с⁻¹ или более, приблизительно 4×10^{-3} с⁻¹, приблизительно 5×10^{-3} с⁻¹ или более, приблизительно 1×10^{-2} с или более, или приблизительно 5×10^{-1} с⁻¹ или более. В пределах компетенции специалиста в данной области находится эмпирическое определение диапазона значений k_{off} , пригодного для взаимодействия конкретного средства и молекулы клетки (см., например, Публикацию патентной заявки США US2014/0295458). Например, можно использовать средство с относительно высоким значением k_{off} , например, более чем $4,0 \times 10^{-4}$ с⁻¹, так что, после разрушения связывающих комплексов, большую часть средства можно удалять или диссоциировать в пределах одного часа. В других случаях, можно использовать средство с более низким значением k_{off} , например, $1,0 \times 10^{-4}$ с⁻¹, так что после разрушения связывающих комплексов, большую часть средства можно удалять или диссоциировать из клетки в пределах приблизительно 3 с половиной часов.

[0480] В некоторых вариантах осуществления, K_D для этой связи, так же как значения K_D , k_{off} и k_{on} для связи, сформированной между участком связывания В средства (например, средства для отбора или стимулирующего средства) и молекулой клеточной поверхности, можно определять любыми пригодными способами, например, посредством флуоресцентного титрования, равновесного диализа или поверхностного плазмонного резонанса.

[0481] В некоторых аспектах, молекула клеточной поверхности представляет собой молекулу, против которой может быть нацелено средство (например, средство для отбора

или стимулирующее средство). В некоторых вариантах осуществления, молекула клеточной поверхности представляет собой пептид или белок, такой как рецептор, например, мембранный рецепторный белок. В некоторых вариантах осуществления, рецептор представляет собой липид, полисахарид или нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления, молекула клеточной поверхности, являющаяся белком, может представлять собой периферический мембранный белок или встроенный в мембрану белок. Молекула клеточной поверхности может, в некоторых вариантах осуществления, иметь один или несколько доменов, пересекающих мембрану. В качестве немногих иллюстративных примеров, мембранный белок с трансмембранным доменом может представлять собой сопряженный с G-белком рецептор, такой как рецепторы пахучих веществ, рецептор родопсина, рецептор родопсина и феромона, рецептор пептидного гормона, вкусовой рецептор, рецептор GABA, рецептор опиата, рецептор серотонина, рецептор Ca²⁺, меланопсин, нейротрансмиттерный рецептор, такой как рецептор управляемого лигандом, потенциалзависимого или механически управляемого канала, включая ацетилхолиновый, никотиновый, адренергический рецептор, рецептор норадреналина, катехоламинов, L-DOPA-, рецептор нейропептида дофамина и серотонина (биогенного амина, эндорфина/энкефалина), рецепторная киназа, такая как серин/треонинкиназа, тирозинкиназа, порин/канал, такой как канал хлорида, канал калия, канал натрия, белок OMP, транспортер ABC (АТФ-связывающий кассетный транспортер), такой как транспортер аминокислоты, транспортер Na-глюкозы, транспортер Na/иодида, ионный транспортер, такой как светособирающий комплекс, цитохром с-оксидаза, АТРаза Na/K, H/K, Ca, рецептор клеточной адгезии, такой как металлопротеиназа, интегрин или кадгерин.

[0482] В некоторых вариантах осуществления, молекула клеточной поверхности может представлять собой антиген, определяющий желательную популяцию или субпопуляцию клеток, например, популяцию или субпопуляцию клеток крови, например, лимфоциты (например, Т-клетки, Т-клетки-помощники, например, CD4+ Т-клетки-помощники, В-клетки или клетки естественные киллеры), моноциты, или стволовые клетки, например, положительные по CD34 периферические стволовые клетки, или экспрессирующие Nanog или Oct-4 стволовые клетки. Примеры Т-клеток включают такие клетки, как специфические для CMV CD8+ Т-лимфоциты, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти и регуляторные Т-клетки (Трег). Иллюстративный пример Трег представляет собой CD4 CD25 CD45RA Трег-клетки, и иллюстративный пример Т-клеток памяти представляет собой специфические для CD62L CD8+ центральные Т-клетки памяти. Молекула клеточной поверхности может также представлять собой маркер для клетки опухоли.

[0483] Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления, средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) имеет, в дополнение к участку связывания В, который является способным связывать молекулу клеточной поверхности, партнер по связыванию С. В некоторых аспектах, этот партнер по

связыванию С является способным связывать участок связывания Z реагента (например, реагента для отбора или стимулирующего реагента (например, олигомерный стимулирующий реагент)) где реагент имеет один или несколько участков связывания для партнера по связыванию С. В некоторых вариантах осуществления, нековалентная связь, которая может формироваться между партнером по связыванию С, включенным в средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), и участком(участками) связывания Z реагента (например, реагента для отбора или стимулирующего реагента (например, олигомерного стимулирующего реагента)), может иметь любую желательную силу и аффинность, и может являться поддающейся разрушению или обратимой в условиях, в которых осуществляют способ. Средство (например, связывающее рецептор средство или средство для отбора) может включать по меньшей мере один, включая два, три или более, дополнительных партнеров по связыванию С, и реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент (например, олигомерный стимулирующий реагент)) может включать по меньшей мере два, например, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или более участков связывания Z для партнера по связыванию С, включенного в средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство). Как описано в Патенте США 7776562, Патенте США 8298782 или Международной патентной заявке WO 2002/054065, можно выбирать любую комбинацию партнера по связыванию С и реагента с одним или несколькими соответствующими участками связывания Z, например, так что партнер по связыванию С и участок связывания Z являются способными обратимо связываться в комплексе, например, чтобы вызывать эффект авидности.

[0484] Партнер по связыванию С, включенный в средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), может, например, быть основан на углеводороде (включая полимерный) и включает группы азота, фосфора, серы, карбена, галогена или псевдогалогена. В некоторых аспектах, он может представлять собой спирт, органическую кислоту, неорганическую кислоту, амин, фосфин, тиол, дисульфид, алкан, аминокислоту, пептид, олигопептид, полипептид, белок, нуклеиновую кислоту, липид, сахарид, олигосахарид или полисахарид. В качестве дополнительных примеров, он может также представлять собой катион, анион, поликатион, полианион, поликатион, электролит, полиэлектролит, углеродную нанотрубку или углеродную нанопену. Как правило, такой партнер по связыванию имеет более высокую аффинность для участка связывания реагента, чем для другого материала. Примеры соответствующего партнера по связыванию С включают, но без ограничения, краун-эфир, иммуноглобулин, его фрагмент и белковую связывающую молекулу с антителоподобными функциями.

[0485] В некоторых вариантах осуществления, партнер по связыванию С, включенный в средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), включает биотин, и реагент включает аналог стрептавидина или аналог авидина, который обратимо связывает биотин. В некоторых вариантах осуществления, партнер по связыванию С, включенный в средство (например, средство для отбора или

стимулирующее средство), включает аналог биотина, который обратимо связывает стрептавидин или авидин, и реагент включает стрептавидин, авидин, аналог стрептавидина или аналог авидина, который обратимо связывает соответствующий аналог биотина. В некоторых вариантах осуществления, партнер по связыванию С, включенный в средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), включает связывающий стрептавидин или авидин пептид, и реагент включает стрептавидин, авидин, аналог стрептавидина или аналог авидина, который обратимо связывает соответствующий связывающий стрептавидин или авидин пептид.

[0486] В некоторых вариантах осуществления, реагент (например, реагент для отбора или стимулирующий реагент) представляет собой стрептавидин, такой как мутеин стрептавидина включая любые, описанные выше (например, *указанные в SEQ ID NO: 3-6, 104, 105*), и партнер по связыванию С, включенный в средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), может включать связывающий стрептавидин пептид. В некоторых вариантах осуществления, связывающий стрептавидин пептид может включать последовательность с общей формулой, указанной в SEQ ID NO: 9, например, содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность имеет общую формулу, указанную в SEQ ID NO: 11, такую, как указано в SEQ ID NO: 12. В одном примере, пептидная последовательность представляет собой Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (также называемую Strep-меткой®, указанной в SEQ ID NO: 7). В одном примере, пептидная последовательность представляет собой Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (также называемую Strep-меткой® II, указанной в SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд содержит последовательную аранжировку по меньшей мере двух связывающих стрептавидин модулей, где расстояние между двумя модулями составляет по меньшей мере 0 и не более чем 50 аминокислот, где one связывающий модуль имеет 3-8 аминокислот и содержит по меньшей мере последовательность His-Pro-Хаа (SEQ ID NO: 9), где Хаа представляет собой глутамин, аспарагин или метионин, и где другой связывающий модуль имеет такой же или отличный пептидный лиганд стрептавидина, такой, как указано в SEQ ID NO: 11 (см., например, Публикацию международной патентной заявки PCT No. WO02/077018; Патент США No. 7981632). В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд содержит последовательность, имеющую формулу, указанную в любой из SEQ ID NO: 13 или 14. В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд имеет последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 15-19. В большинстве случаев, все эти связывающие стрептавидин пептиды связывают одинаковый участок связывания, а именно связывающий биотин участок стрептавидина. Если один или несколько таких связывающих стрептавидин пептидов используют в качестве партнеров по связыванию С, например, С1 и С2, реагент для мультимеризации представляет собой, как правило, мутеин стрептавидина.

[0487] В некоторых вариантах осуществления, связывающий стрептавидин пептид можно дополнительно модифицировать. В некоторых вариантах осуществления,

связывающий стрептавидин пептид может включать пептидную последовательность Tyr-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (также называемую Strep-меткой® II, указанной в SEQ ID NO: 8), конъюгированную с заряженным trisNTA никеля (также называемую His-STREPPER или адаптер His/Strep-метка®II).

[0488] В некоторых вариантах осуществления, партнер по связыванию С средства (например, связывающего рецептор средства или средства для отбора) включает группу, известную специалисту в данной области как аффинная метка. В таком варианте осуществления, реагент может включать соответствующий партнер по связыванию, например, антитело или фрагмент антитела, как известно, связывающий аффинную метку. В качестве немногих иллюстративных примеров известных аффинных меток, партнер по связыванию С, включенный в средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), может включать динитрофенол или дигоксигенин, олигогистидин, полигистидин, домен иммуноглобулина, связывающий мальтозу белок, глутатион-S-трансферазу (GST), связывающий хитин белок (CBP) или тиоредоксин, связывающий кальмодулин пептид (CBP), FLAG'-пептид, HA-метку (последовательность: Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala) (SEQ ID NO: 20), VSV-G-метку (последовательность: Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys) (SEQ ID NO: 21), HSV-метку (последовательность: Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp) (SEQ ID NO: 22), эпитоп T7 (Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly) (SEQ ID NO: 23), связывающий мальтозу белок (MBP), эпитоп HSV с последовательностью Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp (SEQ ID NO: 24) гликопротеина D вируса простого герпеса, эпитоп «мус» с последовательностью фактора транскрипции c-мус Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu (SEQ ID NO: 25), V5-метку (последовательность: Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) (SEQ ID NO: 26) или глутатион-S-трансферазу (GST). В таких вариантах осуществления, комплекс, сформированный между одним или несколькими участками связывания Z реагента, который может представлять собой антитело или фрагмент антитела, и антигеном, можно разрушать конкурентным способом посредством добавления свободного антигена, *т.е.* свободного пептида (эпитопной метки) или свободного белка (такого как MBP или CBP). В некоторых вариантах осуществления, аффинная метка также может представлять собой олигонуклеотидную метку. В некоторых случаях, такую олигонуклеотидную метку можно, например, использовать для гибридизации с олигонуклеотидом с комплементарной последовательностью, связанным с реагентом для отбора или включенным в него.

[0489] Дополнительные примеры пригодного партнера по связыванию С включают, но без ограничения, лектин, белок А, белок G, металл, ион металла, производные нитрилотриуксусной кислоты (NT A), RGD-мотивы, декстран, полиэтиленимин (PEI), окислительно-восстановительный полимер, гликопротеины, аптамеры, краситель, амилозу, мальтозу, целлюлозу, хитин, глутатион, кальмодулин, желатин, полимиксин, гепарин, NAD, NADP, лизин, аргинин, бензамидин, поли-U или

олиго-dT. Известно, что лектины, такие как конкавалин А, связывают полисахариды и гликозилированные белки. Иллюстративный пример красителя представляет собой триазиновый краситель, такой как Cibacron синий F3G-A (CB) или красный HE-3B, которые специфически связывают NADH-зависимые ферменты. Как правило, зеленый А связывает белки Со А, человеческий сывороточный альбумин и дегидрогеназы. В некоторых случаях, красители 7-аминоактиномицин D и 4',6-диамидино-2-фенилиндол связывают ДНК. В общем, катионы металлов, таких как Ni, Cd, Zn, Со или Cu, как правило, присутствуют для связывания аффинных меток, таких как олигогистидин, содержащий последовательность, включающую гексагистидин, или метку His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys (MAT-метку) (SEQ ID NO: 35) и метиловый сложный эфир N-метакрилоил-(L)-цистеина.

[0490] В некоторых вариантах осуществления, связывание между партнером по связыванию С, включенным в средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) и одним или несколькими участками связывания Z реагента происходит в присутствии двухвалентного, трехвалентного или четырехвалентного катиона. В связи с этим, в некоторых вариантах осуществления, реагент включает двухвалентный, трехвалентный или четырехвалентный катион, как правило, удерживаемый, например связываемый в комплекс, посредством пригодного хелатора. В некоторых вариантах осуществления, партнер по связыванию С, включенный в средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) может включать группу, включающую, например, связывающую в комплекс, двухвалентный, трехвалентный или четырехвалентный катион. Примеры соответствующего хелатора металла включают, но без ограничения, этилендиамин, этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), этиленгликольтетрауксусную кислоту (EGTA), диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DTPA), N, N-бис(карбоксиметил)глицин (также называемый нитрилотриуксусной кислотой, NTA), 1,2-бис(о-аминофенокси)этан-N, N,N',N'-тетрауксусную кислоту (ВАРТА), 2,3-димеркапто-1-пропанол (димеркапрол), порфин и гем. В качестве примера, EDTA образует комплекс с большинством одновалентных, двухвалентных, трехвалентных и четырехвалентных ионов металлов, например, таких как серебро (Ag^+), кальций (Ca^{2+}), марганец (Mn^{2+}), медь (Cu^{2+}), железо (Fe^{2+}), кобальт (Co^+) и цирконий (Zr^{4+}), в то время как ВАРТА является специфической для Ca^{2+} . В качестве иллюстративного примера, стандартный способ, используемый в данной области, представляет собой образование комплекса между олигогистидиновой меткой и ионами меди (Cu^{2+}), никеля (Ni^{2+}), кобальта (Co^{2+}) или цинка (Zn^{2+}), предоставляемыми посредством хелатора нитрилотриуксусной кислоты (NTA).

[0491] В некоторых вариантах осуществления, партнер по связыванию С, включенный в средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), включает связывающий кальмодулин пептид, и реагент включает мультимерный кальмодулин, как описано, например, в Патенте США 5985658. В некоторых вариантах осуществления, партнер по связыванию С, включенный в средство (например, средство

для отбора или стимулирующее средство), включает пептид FLAG, и реагент включает антитело, связывающее пептид FLAG, например, пептид FLAG, который связывается с моноклональным антителом 4E11, как описано в Патенте США 4851341. В одном варианте осуществления, партнер по связыванию С, включенный в средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), включает олигогистидиновую метку, и реагент включает антитело или ион переходного металла, связывающиеся с олигогистидиновой меткой. В некоторых случаях, разрушение всех этих образованных в результате связывания комплексов можно осуществлять посредством хелатирования ионов металлов, например, хелатирования кальция, например, посредством добавления EDTA или EGTA. В некоторых вариантах осуществления, кальмодулин, антитела, такие как 4E11 или хелатированные ионы металлов, или свободные хелаторы, можно мультимеризовать посредством общепринятых способов, например, посредством биотинилирования и образования комплексов со стрептавидином или авидином, или их олигомерами, или посредством введения карбоксильных остатков в полисахарид, например, декстран, в основном, как описано в Noguchi, A, et al. *Bioconjugate Chemistry* (1992) 3, 132-137 на первой стадии, и связывания кальмодулина, или антител, или хелатированных ионов металлов, или свободных хелаторов, посредством первичных аминогрупп с карбоксильными группами в полисахаридном, например декстрановом, остове с использованием общепринятых карбодиимидных химических реакций, на второй стадии. В некоторых таких вариантах осуществления, связывание между партнером по связыванию С, включенным в средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), и одним или несколькими участками связывания Z реагента можно разрушать посредством хелатирования ионов металлов. Хелатирование металла можно, например, осуществлять посредством добавления EGTA или EDTA.

[0492] В некоторых вариантах осуществления, средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), которое специфически связывает молекулу клеточной поверхности, может, например, состоять из антитела, его фрагмента или белковой связывающей молекулы с антителоподобными функциями. В некоторых вариантах осуществления, участок связывания В средства представляет собой связывающий участок антитела, например, представляет собой или содержит одну или несколько определяющих комплементарность областей (CDR) из антитела. Примеры (рекомбинантных) фрагментов антител включают, но без ограничения, фрагменты Fab, фрагменты Fv, одноцепочечные фрагменты Fv (scFv), двухвалентный фрагмент антитела, такой как (Fab)₂'-фрагмент, диатела, триатела (Piades, P., et al, *FEB S Lett* (1997) 409, 437-441), декатела (Stone, E., et al, *Journal of Immunological Methods* (2007) 318, 88-94) и другие доменные антитела (Holt, L.J., et al, *Trends Biotechnol.* (2003), 21, 11, 484-490). В некоторых вариантах осуществления, средство (например, связывающее рецептор средство или средство для отбора) может содержать двухвалентную белковую искусственную связывающую молекулу, такую как димерный мутеин липокалина, также известный как «дуокалин».

[0493] В некоторых вариантах осуществления, средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) может иметь один участок связывания В, т.е., оно может являться одновалентным. Примеры одновалентного средства (например, средства для отбора или стимулирующего средства) включают, но без ограничения, одновалентный фрагмент антитела, белковую связывающую молекулу с антителоподобными свойствами связывания или молекулу МНС. Примеры одновалентных фрагментов антител включают, но без ограничения, фрагмент Fab, фрагмент Fv и одноцепочечный фрагмент Fv (scFv), включая двухвалентный одноцепочечный фрагмент Fv.

[0494] В некоторых вариантах осуществления, средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как фрагменты Fab, фрагменты Fv, одноцепочечные фрагменты Fv (scFv), двухвалентный фрагмент антитела, такой как F(ab')₂-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) представляет собой исходное антитело или происходит из исходного антитела, как известно, связывающего представляющую интерес молекулу клетки. Различные молекулы антител или их фрагменты против молекул поверхности клетки хорошо известны в данной области, и любое из их множества можно использовать в качестве средств в способах по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство) представляет собой антитело или его фрагмент, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в варибельной тяжелой цепи исходного или эталонного антитела, например, для получения антитела с измененной аффинностью или имеющего достаточно быструю скорость диссоциации, как описано выше. Например, примеры таких мутаций известны в контексте мутантов антитела против CD4 13B8.2 (см., например, Патенты США No. 7482000, Публикацию патентной заявки США No. US2014/0295458 или Публикацию международной патентной заявки No. WO2013/124474), и любую из таких мутаций можно получать в другом исходном или эталонном антителе.

[0495] В некоторых аспектах, средство (например, средство для отбора или стимулирующее средство), которое может являться одновалентным, например, содержит одновалентный фрагмент антитела или одновалентную искусственную связывающую молекулу (белковую или другую), такую как мутеин на основе полипептида из семейства липокалинов (также известный как «антикалин®»), или двухвалентную молекулу, такую как антитело или фрагмент, в которых сохранены оба участка связывания, например, фрагмент F(ab')₂.

[0496] Пример белковой связывающей молекулы с антителоподобными функциями включает мутеин на основе полипептида из семейства липокалинов (см., например, WO 03/029462, Beste et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1999) 96, 1898-1903). Как правило, липокалина, такие как связывающий билин белок, ассоциированный с желатиназой липокалин нейтрофилов человека, аполипопротеин D человека или липокалин слезной жидкости человека, имеют участки связывания природного лиганда, которые можно

модифицировать таким образом, чтобы они связывали данную мишень. Дополнительные примеры белковой связывающей молекулы с антителоподобными свойствами связывания, которую можно использовать в качестве средства (например, средства для отбора или стимулирующего средства), которое специфически связывает молекулу клеточной поверхности, включают, но без ограничения, так называемые глутела (см., например, Международную патентную заявку WO 96/23879), белки на основе анкиринового каркаса (Mosavi, L.K., et al, *Protein Science* (2004) 13, 6, 1435-1448) или кристаллинового каркаса (например, Международная патентная заявка WO 01/04144), белки, описанные в Skerra, J. *Mol. Recognit.* (2000) 13, 167-187, аднектины, тетранектины и авимеры. Как правило, авимеры, включая мультивалентные авимерные белки, образующиеся посредством перестановки экзонов в семействе рецепторных доменов человека, содержат так называемые А-домены, встречающиеся в виде цепочек из множества доменов в некоторых рецепторах клеточной поверхности (Silverman, J., et al, *Nature Biotechnology* (2005) 23, 1556-1561). Аднектины, как правило, происходящие из домена фибронектина человека, как правило, содержат три петли, которые можно конструировать для иммуноглобулиноподобного связывания с мишенями (Gill, D.S. & Damle, N.K., *Current Opinion in Biotechnology* (2006) 17, 653-658). Тетранектины, как правило, происходящие из соответствующего гомотримерного белка человека, подобным образом, как правило, содержат области петель в домене лектина С-типа, которые можно конструировать для желательного связывания. Пептоиды, которые могут, в некоторых случаях, действовать в качестве белковых лигандов, как правило, представляют собой олиго(N-алкил)глицины, которые отличаются от пептидов тем, что боковая цепь соединена с атомом амидного азота, а не с атомом углерода. Пептоиды, как правило, являются устойчивыми к действию протеаз и других модифицирующих ферментов и могут иметь намного более высокую клеточную проницаемость, чем пептиды (см., например, Kwon, Y.-U., и Kodadek, T., *J. Am. Chem. Soc.* (2007) 129, 1508-1509).

[0497] Дополнительные примеры подходящих белковых связывающих молекул включают, но без ограничения, EGF-подобный домен, Kringle-домен, домен фибронектина типа I, домен фибронектина типа II, домен фибронектина типа III, домен PAN, домен Gla, домен SRCR, домен Кунитца/ингибитора трипсина поджелудочной железы быка, тендамистат, домен ингибитора сериновых протеаз типа Kazal, трилистниковый домен (Р-типа), домен типа С фактора фон Виллебранда, подобный анафилатоксину домен, домен CUB, тиреоглобулиновый повтор типа I, домен класса А рецептора LDL, домен Sushi, домен Link, домен тромбоспондина типа I, домен иммуноглобулина или иммуноглобулиноподобный домен (например, доменные антитела или антитела верблюдовых, содержащие только тяжелые цепи), домен лектина С-типа, домен MAM, домен типа А фактора фон Виллебранда, домен соматомедина В, коровий домен WAP-типа с четырьмя дисульфидными связями, домен F5/8 типа С, домен гемопексина, домен SH2, домен SH3, EGF-подобный домен ламининового типа, домен С2, «каппа-антитела» (Ill et al. *Protein Eng* (1997) 10, 949-57, так называемое «миниантитело»

(Martin et al, EMBO J (1994) 13, 5303-5309), диатело (Holliger et al, PNAS USA (1993)90, 6444-6448), так называемые «янусины» (Traunecker et al, EMBO J (1991) 10, 3655-3659, или Traunecker et al, Int J Cancer (1992) Suppl 7, 51-52), нанотело, микротело, аффилин, аффитело, ноттин, убиквитин, белок с цинковыми пальцами, аутофлуоресцентный белок или белок с богатыми лейцином повторами. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты с антителоподобными функциями может представлять собой аптамер. Как правило, аптамер сворачивается в определенный трехмерный мотив и имеет высокую аффинность для данной структуры мишени.

III. СОСТАВЫ БЕССЫВОРОТОЧНЫХ СРЕД И РОДСТВЕННЫЕ КОМПОНЕНТЫ

[0498] Одну или несколько стадий представленных способов можно проводить в присутствии бессывороточных сред, содержащих свободной формы глутамин (т.е., L-глутамин) в базовой среде. Можно добавлять одну или несколько следующих добавок, включая одну или несколько добавок, содержащих по меньшей мере один белок, такой как заменяющий сыворотку белок, или один или несколько других компонентов, способствующих поддержанию, росту и/или размножению клеток. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит синтетическую аминокислоту (например, дипептидную форму L-глутамин, например, L-аланил-L-глутамин), в некоторых вариантах осуществления, концентрация синтетической аминокислоты (например, дипептидной формы L-глутамин, например, L-аланил-L-глутамин) составляет от точно или приблизительно 0,5 мМ до точно или приблизительно 5 мМ (например, 2 мМ). В некоторых вариантах осуществления, концентрация L-глутамин составляет от точно или приблизительно 0,5 мМ до точно или приблизительно 5 мМ (например, 2 мМ). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок представляет собой белок человека или рекомбинантный белок, такой как заменяющий сыворотку белок, например, альбумин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит один или несколько рекомбинантных цитокинов (например, IL-2, IL-7 или IL-15). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно не содержит один или несколько рекомбинантных цитокинов (например, IL-2, IL-7 или IL-15). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда не содержит фенол красный.

[0499] В некоторых вариантах осуществления, представленную бессывороточную среду изготавливают или получают из жидкой базовой среды и одной или нескольких добавок.

[0500] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда может содержать синтетическую аминокислоту, которая является способной к превращению в L-глутамин в культуре клеток, такую как синтетическая аминокислота, представляющая собой дипептидную форму L-глутамин, например, L-аланил-L-глутамин. В некоторых случаях, синтетическая аминокислота представлена в базовой среде, в которой содержится свободный L-глутамин и белок. В некоторых вариантах осуществления,

концентрация синтетической аминокислоты (например, дипептидной формы L-глутамин, например, L-аланил-L-глутамин) составляет от точно или приблизительно 0,5 мМ до точно или приблизительно 5 мМ (например, 2 мМ). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок представляет собой происходящий из человеческого белок, рекомбинантный белок или и тот, и другой. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит фенол красный.

[0501] В некоторых вариантах осуществления, среди добавок для получения бессывороточных сред присутствует добавка, содержащая по меньшей мере один белок и свободную форму глутамин, например, L-глутамин, где добавку замораживают, или замораживают после того, как L-глутамин становится ее компонентом. В некоторых вариантах осуществления, концентрация L-глутамин в добавке составляет менее чем 200 мМ, например, менее чем 150 мМ, 100 мМ или менее, например, 20 мМ-120 мМ, или 40 мМ-100 мМ, например, точно или приблизительно 80 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация L-глутамин после объединения добавки с базовой средой составляет от приблизительно 0,5 мМ до приблизительно 5 мМ (например, 2 мМ). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок не имеет происхождения, отличного от млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок представляет собой человеческий белок или происходящий из человеческого белок, или является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок включает альбумин, например, человеческий или рекомбинантный человеческий альбумин.

А. Базовая среда

[0502] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит источник углерода, такой как глюкоза, воду, одну или несколько солей и источник аминокислот и азота.

[0503] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления, аминокислота включает аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аспарагин, серин, глутамин, гистидин, глицин, треонин, аргинин, аланин, тирозин, цистеин, валин, метионин, норвалин, триптофан, фенилаланин, изолейцин, лейцин, лизин, гидроксипролин, саркозин и/или пролин.

[0504] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит по меньшей мере одну синтетическую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота является способной к переводу в свободную форму глутамин (т.е., L-глутамин) в культуре клеток, содержащей клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка содержит клетку человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка содержит иммуноцит. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой генетически модифицированную клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой генетически модифицированную Т-клетку. В

некоторых вариантах осуществления, клетка является генетически модифицированной для экспрессии рекомбинантного рецептора (например, химерного рецептора антигена). В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой экспрессирующие химерный рецептор антигена (CAR) Т-клетки.

[0505] В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота представляет собой стабилизированную форму глутамин (т.е., L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота является более стабильной, чем глутамин (т.е., L-глутамин), в водном растворе (например, в базовой среде). В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота не образует значительного количества глутамин в базовой среде. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота не образует значительного количества пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в базовой среде. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота не образует значительного количества глутамин (т.е., L-глутамин) в течение по меньшей мере приблизительно 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 14 суток в базовой среде. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота не образует значительного количества глутамин (т.е., L-глутамин) в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель в базовой среде. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота не образует значительного количества глутамин (т.е., L-глутамин) в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев в базовой среде. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота не образует значительного количества глутамин (т.е., L-глутамин) в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет в базовой среде. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота не образует значительного количества пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере приблизительно 1, 3, 5, 7, 9, 11 13 или 14 суток в базовой среде. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота не образует значительного количества пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель в базовой среде. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота не образует значительного количества пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев в базовой среде. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота не образует значительного количества пирролидонкарбоновой кислоты или аммиака в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, или 5 лет в базовой среде.

[0506] В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота является растворимой в водном растворе (например, в базовой среде). В некоторых вариантах осуществления, растворимость синтетической аминокислоты в водном растворе выше, чем свободной формы глутамин (т.е., L-глутамин).

[0507] В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота является способной к транспортировке в клетку, где она может быть превращена в

свободную форму глутамин (т.е., L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления, клетка содержит иммуноцит. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой генетически модифицированную клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой генетически модифицированную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка является генетически модифицированной для экспрессии рекомбинантного рецептора (например, химерного рецептора антигена). В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой экспрессирующие химерный рецептор антигена (CAR) Т-клетки.

[0508] В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота представляет собой дипептид. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота представляет собой трипептид. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота представляет собой дипептидную форму L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин), такую как дипептид в *Glutamax™*, который спонтанно не деградирует в базовой среде.

[0509] В некоторых вариантах осуществления, концентрация дипептидной формы L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин) в базовой среде составляет приблизительно 0,5 мМ-5 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация дипептидной формы L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин) в базовой среде составляет точно или приблизительно 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация дипептидной формы L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин) составляет точно или приблизительно 0,5 мМ-1 мМ, 0,5 мМ-1,5 мМ, 0,5 мМ-2 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-4 мМ, 0,5 мМ-4,5 мМ, 0,5 мМ-5 мМ, 1 мМ-1,5 мМ, 1 мМ-2 мМ, 1 мМ-2,5 мМ, 1 мМ-3 мМ, 1 мМ-3,5 мМ, 1 мМ-4 мМ, 1 мМ-4,5 мМ, 1 мМ-5 мМ, 1,5 мМ-2 мМ, 1,5 мМ-2,5 мМ, 1,5 мМ-3 мМ, 1,5 мМ-3,5 мМ, 1,5 мМ-4 мМ, 1,5 мМ-4,5 мМ, 1,5 мМ-5 мМ, 2 мМ-2,5 мМ, 2 мМ-3 мМ, 2 мМ-3,5 мМ, 2 мМ-4 мМ, 2 мМ-4,5 мМ, 2 мМ-5 мМ, 2,5 мМ-3 мМ, 2,5 мМ-3,5 мМ, 2,5 мМ-4 мМ, 2,5 мМ-4,5 мМ, 2,5 мМ-5 мМ, 3 мМ-3,5 мМ, 3 мМ-4 мМ, 3 мМ-4,5 мМ, 3 мМ-5 мМ, 3,5 мМ-4 мМ, 3,5 мМ-4,5 мМ, 3,5 мМ-5 мМ, 4 мМ-4,5 мМ, 4 мМ-5 мМ или 4,5 мМ-5 мМ, включая каждую. В некоторых вариантах осуществления, концентрация дипептидной формы L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин) в базовой среде составляет точно или приблизительно 5 мМ-7,5 мМ, 5 мМ-10 мМ, 5 мМ-12,5 мМ, 5 мМ-15 мМ, 5 мМ-17,5 мМ, 5 мМ-20 мМ, 7,5 мМ-10 мМ, 7,5 мМ-12,5 мМ, 7,5 мМ-15 мМ, 7,5 мМ-17,5 мМ, 7,5 мМ-20 мМ, 10 мМ-12,5 мМ, 10 мМ-15 мМ, 10 мМ-17,5 мМ, 10 мМ-20 мМ, 12,5 мМ-15 мМ, 12,5 мМ-17,5 мМ, 12,5 мМ-20 мМ, 15 мМ-17,5 мМ, 15 мМ-20 мМ или 17,5 мМ-20 мМ, включая каждую. В некоторых вариантах осуществления, концентрация дипептидной формы L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин) в базовой среде составляет по меньшей мере точно или приблизительно 0,5 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация дипептидной формы L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин) в базовой среде составляет точно или

приблизительно 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в базовой среде составляет самое большое точно или приблизительно 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ, 5 мМ, 5,5 мМ, 6 мМ, 6,5 мМ, 7 мМ, 7,5 мМ, 8 мМ, 8,5 мМ, 9 мМ, 9,5 мМ, 10 мМ, 12,5 мМ, 15 мМ, 17,5 мМ или 20 мМ.

[0510] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит L-глутамин или не содержит значительное количество L-глутамина.

[0511] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, концентрация L-глутамина в базовой среде составляет точно или приблизительно или менее чем точно или приблизительно 0,1 мМ, 0,2 мМ, 0,3 мМ, 0,4 мМ или 0,5 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация L-глутамина в базовой среде составляет точно или приблизительно или менее чем точно или приблизительно 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация L-глутамина в базовой среде составляет точно или приблизительно 2 мМ.

[0512] В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько аминокислот, включая по меньшей мере одну синтетическую аминокислоту, которая является способной к превращению в свободную форму глутамина (т.е., L-глутамин), например, дипептидную форму L-глутамина, такую как L-аланил-L-глутамин, представлена в базовой среде. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда представляет собой искусственную или синтетическую среду. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда представляет собой или содержит сбалансированный солевой раствор (например, PBS, DPBS, HBSS, EBSS). В некоторых вариантах осуществления, базовая среда выбрана из среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальной поддерживающей среды (MEM), базовой среды Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальной поддерживающей среды Глазго (GMEM), минимальной поддерживающей среды альфа (альфа MEM), среды Дульбекко в модификации Искова и M199. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда представляет собой комплексную среду (например, RPMI-1640, IMDM). В некоторых вариантах осуществления, базовая среда представляет собой базовую среду для размножения T-клеток OpTmizer™ CTST™ (ThermoFisher).

[0513] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит смесь питательных веществ из неорганических солей, сахаров, аминокислот, необязательно, также содержащую витамины, органические кислоты, антиоксиданты и/или буферы.

[0514] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит CO_3^{2-} и HCO_3^- . В некоторых вариантах осуществления, содержание $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ в базовой среде уравнивают с использованием газообразного CO_2 (например, 5-10%), таким образом, поддерживают оптимальный pH в среде. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит цвиттер-ион, например, HEPES. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит фенол красный. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит фенол красный.

[0515] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит неорганическую соль. В некоторых вариантах осуществления, неорганическая соль способствует осмотическому балансу. В некоторых вариантах осуществления, неорганическая соль регулирует мембранный потенциал посредством предоставления ионов натрия, калия и кальция.

[0516] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит один или несколько углеводов. В некоторых вариантах осуществления, углевод содержит глюкозу. В некоторых вариантах осуществления, углевод содержит галактозу. В некоторых вариантах осуществления, углевод содержит мальтозу. В некоторых вариантах осуществления, углевод содержит фруктозу.

[0517] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит жирную кислоту. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит липид. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит витамин (например, витамин А, витамин В7, витамин В9, витамин В12, витамин С, витамин Е). В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит микроэлемент. В некоторых вариантах осуществления, микроэлемент содержит медь. В некоторых вариантах осуществления, микроэлемент содержит цинк. В некоторых вариантах осуществления, микроэлемент содержит селен. В некоторых вариантах осуществления, микроэлемент содержит промежуточное соединение трикарбоновой кислоты.

[0518] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит смесь неорганических солей, сахаров, аминокислот и, необязательно, витаминов, органических кислот и/или буферов, или других хорошо известных питательных веществ для культуральных сред. В дополнение к питательным веществам, среда также способствует поддержанию рН и осмоляльности. В некоторых аспектах, реагенты из базовой среды поддерживают рост, пролиферацию и/или размножение клеток. Широкое множество базовых сред являются доступными и включают среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), среду Roswell Park Memorial Institute (RPMI), среда Дульбекко в модификации Искова и среду Хэма. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда представляет собой среду Дульбекко в модификации Искова, RPMI-1640 или α -MEM.

[0519] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит белка. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит человеческого белка (например, человеческого сывороточного белка). В некоторых вариантах осуществления, базовая среда является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит сыворотки, полученной от человека. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит рекомбинантного белка. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда не содержит человеческого белка и рекомбинантного белка.

[0520] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда содержит белок или пептид. В некоторых вариантах осуществления, белок представляет собой альбумин или заменитель альбумина. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет

собой происходящий из человеческого альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой природный человеческий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный человеческий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин из не относящегося к человеку источника. Заменители альбумина могут представлять собой любой источник белка или полипептида. Примеры таких образцов белка или полипептида включают, но без ограничения, экстракт гипофиза быка, гидролизат растений (например, гидролизат риса), эмбриональный телячий альбумин (фетуин), яичный альбумин, человеческий сывороточный альбумин (HSA) или другие происходящие из животных альбумины, куриный экстракт, бычий эмбриональный экстракт, AlbuMAX® I и AlbuMAX® II. В некоторых вариантах осуществления, белок или пептид содержит трансферрин. В некоторых вариантах осуществления, белок или пептид содержит фибронектин. В некоторых вариантах осуществления, белок или пептид содержит апротинин. В некоторых вариантах осуществления, белок содержит фетуин.

[0521] В некоторых вариантах осуществления, базовая среда (например, базовая среда для размножения Т-клеток OpTmizer™ CTST™) представляет собой жидкий состав. В некоторых вариантах осуществления, базовую среду не замораживают или снабжают инструкциями не замораживать (например, в соответствии с ее протоколом) до намеченного использования. В некоторых вариантах осуществления, базовую среду хранят при точно или приблизительно 2°C-8°C. В некоторых вариантах осуществления, базовую среду хранят при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда является стабильной в течение по меньшей мере точно или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, или 6 недель при хранении при 2°C-8°C. В некоторых вариантах осуществления, базовая среда является стабильной в течение по меньшей мере точно или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев при хранении при 2°C-8°C.

В. Дополнительные компоненты и добавки

[0522] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда включает базовую среду и один или несколько дополнительных компонентов, которые можно предоставлять посредством одной или нескольких добавок. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько добавок включает по меньшей мере первую добавку, содержащую свободную форму глутамина (т.е., L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления, такая добавка является замороженной перед использованием и/или включением в базовую среду. В некоторых вариантах осуществления, добавка, такая как описанные в настоящем описании, предназначена для использования в качестве добавки для сред (например, добавки для сред для базовой среды). В некоторых вариантах осуществления, первая добавка и/или дополнительная добавка обеспечивает поддержание клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой первичную клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой иммуноцит. В

некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой CD3 Т-клетку, CD4 Т-клетку или CD8 Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку от человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой иммунцит от человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой Т-клетку от человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой первичный иммунцит от человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой генетически модифицированную клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой генетически модифицированную клетку, полученную от человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой генетически модифицированную Т-клетку (например, экспрессирующую химерный рецептор антигена (CAR), Т-клетку) от человека.

[0523] В некоторых вариантах осуществления, первую добавку хранят или рекомендовано хранить от точно или приблизительно -20°C до точно или приблизительно 0°C до предназначенного для нее применения. В некоторых вариантах осуществления, добавку хранят или рекомендовано хранить при менее чем приблизительно 0°C . В некоторых вариантах осуществления, добавку замораживают немедленно или вскоре после того, как свободная форма глутамин (т.е., L-глутамин) становится ее компонентом, до момента времени, когда добавку используют для предназначенного для нее применения. В некоторых вариантах осуществления, добавка является замороженной в течение большей части времени после того, как свободная форма глутамин (т.е., L-глутамин) становится ее компонентом, до момента времени, когда добавку используют для предназначенного для нее применения. В некоторых вариантах осуществления, добавку не хранят в форме жидкости в течение более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 суток после того, как свободная форма глутамин (т.е., L-глутамин) становится ее компонентом, до момента времени, когда добавку используют для предназначенного для нее применения. В некоторых вариантах осуществления, добавку не хранят в форме жидкости в течение более чем или более чем приблизительно 4, 8, 12, 16, 20 или 24 часов после того, как свободная форма глутамин (т.е., L-глутамин) становится ее компонентом, до момента времени, когда добавку используют для предназначенного для нее применения. В некоторых вариантах осуществления, добавка является замороженной в течение большей части времени как до, так и после того, как свободная форма глутамин (т.е., L-глутамин) становится ее компонентом, до момента времени, когда добавку используют для предназначенного для нее применения. В некоторых вариантах осуществления, добавка находится при комнатной температуре или ниже (например, температура добавки составляет ниже точно или приблизительно 20°C , 15°C , 10°C , 5°C или 0°C), когда свободная форма глутамин (т.е., L-глутамин) становится компонентом добавки. В одном аспекте, присутствие L-глутамин в замороженной добавке обеспечивает ее стабильность до добавления в базовую среду для минимизации изменчивости концентрации глутамин

и/или увеличения концентрации аммиака в бессывороточных средах, которая может происходить из-за нестабильности L-глутамина.

[0524] В некоторых вариантах осуществления, свободная форма L-глутамина в добавке не оседает, когда добавку размораживают. В некоторых вариантах осуществления, свободная форма L-глутамина в добавке не оседает, когда добавка представляет собой жидкость. В некоторых вариантах осуществления, свободная форма L-глутамина в добавке не оседает, когда добавку размораживают при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления, концентрация свободной формы L-глутамина в добавке составляет точно или приблизительно, или менее чем или менее чем приблизительно 400 мМ, 300 мМ, 200 мМ, 180 мМ, 160 мМ, 140 мМ, 120 мМ, 100 мМ или 80 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация L-глутамина в добавке составляет приблизительно 200 мМ.

[0525] В некоторых вариантах осуществления, концентрация свободной формы глутамина (т.е., L-глутамина) в добавке является такой, что после объединения добавки с базовой средой (такой как описанные в настоящем описании), концентрация свободной формы глутамина (т.е., L-глутамина) в средах составляет точно или приблизительно 0,5 мМ-5 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация свободной формы глутамина (т.е., L-глутамина) в базовой среде составляет точно или приблизительно 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация свободной формы глутамина (т.е., L-глутамина) составляет точно или приблизительно 0,5 мМ-1 мМ, 0,5 мМ-1,5 мМ, 0,5 мМ-2 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-4 мМ, 0,5 мМ-4,5 мМ, 0,5 мМ-5 мМ, 1 мМ-1,5 мМ, 1 мМ-2 мМ, 1 мМ-2,5 мМ, 1 мМ-3 мМ, 1 мМ-3,5 мМ, 1 мМ-4 мМ, 1 мМ-4,5 мМ, 1 мМ-5 мМ, 1,5 мМ-2 мМ, 1,5 мМ-2,5 мМ, 1,5 мМ-3 мМ, 1,5 мМ-3,5 мМ, 1,5 мМ-4 мМ, 1,5 мМ-4,5 мМ, 1,5 мМ-5 мМ, 2 мМ-2,5 мМ, 2 мМ-3 мМ, 2 мМ-3,5 мМ, 2 мМ-4 мМ, 2 мМ-4,5 мМ, 2 мМ-5 мМ, 2,5 мМ-3 мМ, 2,5 мМ-3,5 мМ, 2,5 мМ-4 мМ, 2,5 мМ-4,5 мМ, 2,5 мМ-5 мМ, 3 мМ-3,5 мМ, 3 мМ-4 мМ, 3 мМ-4,5 мМ, 3 мМ-5 мМ, 3,5 мМ-4 мМ, 3,5 мМ-4,5 мМ, 3,5 мМ-5 мМ, 4 мМ-4,5 мМ, 4 мМ-5 мМ или 4,5 мМ-5 мМ, включая каждую. В некоторых вариантах осуществления, концентрация свободной формы глутамина (т.е., L-глутамина) в базовой среде составляет точно или приблизительно 5 мМ-7,5 мМ, 5 мМ-10 мМ, 5 мМ-12,5 мМ, 5 мМ-15 мМ, 5 мМ-17,5 мМ, 5 мМ-20 мМ, 7,5 мМ-10 мМ, 7,5 мМ-12,5 мМ, 7,5 мМ-15 мМ, 7,5 мМ-17,5 мМ, 7,5 мМ-20 мМ, 10 мМ-12,5 мМ, 10 мМ-15 мМ, 10 мМ-17,5 мМ, 10 мМ-20 мМ, 12,5 мМ-15 мМ, 12,5 мМ-17,5 мМ, 12,5 мМ-20 мМ, 15 мМ-17,5 мМ, 15 мМ-20 мМ или 17,5 мМ-20 мМ, включая каждую. В некоторых вариантах осуществления, концентрация свободной формы глутамина (т.е., L-глутамина) в базовой среде составляет по меньшей мере точно или приблизительно 0,5 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация свободной формы глутамина (т.е., L-глутамина) в базовой среде составляет самое большее точно или приблизительно 2 мМ.

[0526] В некоторых вариантах осуществления, первая добавка содержит один или несколько дополнительных компонентов. В некоторых вариантах осуществления,

следующая добавка, такая как вторая добавка, представлена для предоставления одного или нескольких дополнительных компонентов. В некоторых вариантах осуществления, добавки, первую добавку и необязательно, одну или несколько следующих добавок, например, вторую добавку, объединяют с базовой средой для предоставления одного или нескольких дополнительных компонентов в базовой среде.

[0527] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают по меньшей мере один белок. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок не имеет происхождения, отличного от млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок представляет собой белок человека или получен от человека. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок включает альбумин, трансферрин, инсулин, фибронектин, апротинин или фетуин. В некоторых вариантах осуществления, белок содержит один или несколько из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно один или несколько из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

[0528] В некоторых вариантах осуществления, белок представляет собой альбумин или заменитель альбумина. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой полученный от человека альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой природный человеческий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный человеческий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин из не относящегося к человеку источника. Заменители альбумина могут представлять собой любой источник белка или полипептида. Примеры таких образцов белка или полипептида включают но без ограничения экстракт гипофиза быка, гидролизат растений (например, гидролизат риса), эмбриональный телячий альбумин (фетуин), яичный альбумин, человеческий сывороточный альбумин (HSA) или другие происходящие из животных альбумины, куриный экстракт, бычий эмбриональный экстракт, AlbuMAX® I и AlbuMAX® II.

[0529] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой человеческий альбумин или происходит из человеческого альбумина. В некоторых вариантах осуществления, альбумин получен из сыворотки человека или плазмы человека. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный альбумин происходит из человеческого. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный альбумин не происходит из человеческого. В некоторых вариантах осуществления, добавка содержит природный альбумин. В

некоторых вариантах осуществления, природный альбумин получен от человека. В некоторых вариантах осуществления, природный альбумин не получен от человека. В некоторых вариантах осуществления, концентрация альбумина в добавке является такой, что после объединения добавки с базовой средой (такой как описанные в настоящем описании), точная или приблизительная концентрация альбумина в средах составляет от точно или приблизительно 0 мг/мл до точно или приблизительно 2 мг/мл, от точно или приблизительно 0 мг/мл до точно или приблизительно 4 мг/мл, от точно или приблизительно 0 мг/мл до точно или приблизительно 6 мг/мл, от точно или приблизительно 0 мг/мл до точно или приблизительно 8 мг/мл, от точно или приблизительно 0 мг/мл до точно или приблизительно 10 мг/мл, от точно или приблизительно 0 мг/мл до точно или приблизительно 12 мг/мл, от точно или приблизительно 2 мг/мл до точно или приблизительно 4 мг/мл, от точно или приблизительно 2 мг/мл до точно или приблизительно 6 мг/мл, от точно или приблизительно 2 мг/мл до точно или приблизительно 8 мг/мл, от точно или приблизительно 2 мг/мл до точно или приблизительно 10 мг/мл, от точно или приблизительно 2 мг/мл до точно или приблизительно 12 мг/мл, от точно или приблизительно 4 мг/мл до точно или приблизительно 6 мг/мл, от точно или приблизительно 4 мг/мл до точно или приблизительно 8 мг/мл, от точно или приблизительно 4 мг/мл до точно или приблизительно 10 мг/мл, от точно или приблизительно 4 мг/мл до точно или приблизительно 12 мг/мл, от точно или приблизительно 6 мг/мл до точно или приблизительно 8 мг/мл, от точно или приблизительно 6 мг/мл до точно или приблизительно 10 мг/мл, от точно или приблизительно 6 мг/мл до точно или приблизительно 12 мг/мл, от точно или приблизительно 8 мг/мл до точно или приблизительно 10 мг/мл, от точно или приблизительно 8 мг/мл до точно или приблизительно 12 мг/мл, от точно или приблизительно 10 мг/мл до точно или приблизительно 12 мг/мл, или от точно или приблизительно 10 мг/мл до точно или приблизительно 15 мг/мл, включая каждую. В некоторых вариантах осуществления, альбумин в средах составляет точно или приблизительно 5 мг/мл.

[0530] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают трансферрин или заменитель трансферрина. В некоторых вариантах осуществления, заменитель трансферрина представляет собой соединение, которым можно заменять трансферрин в добавке для получения результатов, по существу сходных с трансферрином. Примеры заменителей трансферрина включают, но без ограничения, любое соединение хелата железа. Соединения хелата железа, которые можно использовать, включают, но без ограничения хелаты железа этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), этиленгликоль-бис(β -аминоэтилэфир)-N, N,N',N'-тетрауксусной кислоты (EGTA), мезилата дефероксамина, димеркаптопропанола, диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DPTA) и транс-1,2-диаминоциклогексан-N, N,N',N'-тетрауксусной кислоты (CDTA), так же как хелат цитрата железа и хелат сульфата

железа. В некоторых вариантах осуществления, трансферрин представляет собой насыщенный железом трансферрин. В некоторых вариантах осуществления, трансферрин представляет собой насыщенный железом трансферрин человека.

[0531] В некоторых вариантах осуществления, трансферрин или заменитель трансферрина представляет собой человеческий трансферрин или происходит из человеческого трансферрина. В некоторых вариантах осуществления, трансферрин или заменитель трансферрина получен из сыворотки человека или плазмы человека. В некоторых вариантах осуществления, трансферрин или заменитель трансферрина представляет собой рекомбинантный трансферрин. В некоторых вариантах осуществления, концентрация трансферрина является такой, что после объединения добавки с базовой средой (такой как описанные в настоящем описании), концентрация трансферрина в средах составляет от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 50 мг/л, от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 100 мг/л, от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 150 мг/л, от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 200 мг/л, от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 250 мг/л, от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 300 мг/л, от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 350 мг/л, от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 400 мг/л, от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 450 мг/л, от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 500 мг/л, от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 550 мг/л, от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 600 мг/л, от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 650 мг/л, от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 750 мг/л. В некоторых вариантах осуществления, концентрация трансферрина является такой, что после объединения добавки с базовой средой (такой как описанные в настоящем описании), концентрация трансферрина в средах составляет точно или приблизительно 100 мг/л. В некоторых вариантах осуществления, концентрация трансферрина является такой, что после объединения добавки с базовой средой (такой как описанные в настоящем описании), концентрация трансферрина в средах составляет от точно или приблизительно 50 мг/л до точно или приблизительно 150 мг/л.

[0532] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают инсулин или заменитель инсулина. В некоторых вариантах осуществления, заменитель инсулина представляет собой содержащее цинк соединение, которое можно использовать вместо инсулина для получения результатов, по существу сходных с инсулином. Примеры заменителей инсулина включают, но без ограничения, хлорид цинка, нитрат цинка, бромид цинка и сульфат цинка. Ряд видов инсулина известны специалисту в данной области. См. Gilman, A.G. et al, Eds., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Pergamon Press, New York, 1990, pp. 1463-1495. В

некоторых вариантах осуществления, инсулин, а не заменитель инсулина, используют в добавке и среде. В некоторых вариантах осуществления, инсулин представляет собой инсулин цинка. В некоторых вариантах осуществления, инсулин представляет собой человеческий инсулин цинка.

[0533] В некоторых вариантах осуществления, инсулин представляет собой человеческий инсулин или происходит из человеческого инсулина. В некоторых вариантах осуществления, инсулин представляет собой рекомбинантный инсулин. В некоторых вариантах осуществления, инсулин представляет собой рекомбинантный инсулин человека. В некоторых вариантах осуществления, концентрация инсулина (или заменителя инсулина) является такой, что после объединения добавки с базовой средой (такой как описанные в настоящем описании), точная или приблизительная концентрация инсулина (или заменителя инсулина) в средах составляет от приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 2,5 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 5 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 7,5 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 10 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 12,5 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 15 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 17,5 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 20 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 22,5 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 25 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 27,5 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 30 мг/л. В некоторых вариантах осуществления, концентрация инсулина или заменителя инсулина в средах составляет точно или приблизительно 10 мг/л. В некоторых вариантах осуществления, концентрация инсулина или заменителя инсулина в средах составляет от точно или приблизительно 7,5 мг/л до точно или приблизительно 12,5 мг/л.

[0534] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают фактор роста. В некоторых вариантах осуществления, фактор роста содержит эпидермальный фактор роста (EGF). В некоторых вариантах осуществления, фактор роста содержит фактор роста фибробластов (FGF). В некоторых вариантах осуществления, фактор роста содержит инсулиноподобный фактор роста (IGF). В некоторых вариантах осуществления, фактор роста содержит фактор роста нервов (NGF). В некоторых вариантах осуществления, фактор роста содержит фактор роста тромбоцитов (PDGF). В некоторых вариантах осуществления, фактор роста содержит трансформирующий фактор роста (TGF).

[0535] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают гормон (например, гормон роста, инсулин, гидрокортизон, трийодтиронин, эстроген, андроген, прогестерон, пролактин, фолликулостимулирующий гормон, высвобождающий гастрин пептид). В некоторых

вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают альфа-глобулин или бета-глобулин. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают пептид или пептидную фракцию (например, гидролизат белка, полученный из животного, микроорганизма или растения).

[0536] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают липид. В некоторых вариантах осуществления, липид содержит холестерин. В некоторых вариантах осуществления, липид содержит стероид. В некоторых вариантах осуществления, липид содержит жирную кислоту (например, пальмитат, стеарат, олеат, линолеат). В некоторых вариантах осуществления, липид содержит этаноламин. В некоторых вариантах осуществления, липид содержит холин. В некоторых вариантах осуществления, липид содержит инозитол.

[0537] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов содержит переходный металл. В некоторых вариантах осуществления, переходный металл содержит железо. В некоторых вариантах осуществления, переходный металл содержит цинк. В некоторых вариантах осуществления, переходный металл содержит медь. В некоторых вариантах осуществления, переходный металл содержит хром. В некоторых вариантах осуществления, переходный металл содержит иод. В некоторых вариантах осуществления, переходный металл содержит кобальт. В некоторых вариантах осуществления, переходный металл содержит селен. В некоторых вариантах осуществления, переходный металл содержит магний. В некоторых вариантах осуществления, переходный металл содержит молибден.

[0538] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают витамин. В некоторых вариантах осуществления, витамин содержит жирорастворимый витамин (например, витамин А, витамин D, витамин Е, витамин К). В некоторых вариантах осуществления, витамин содержит водорастворимый витамин (например, В1, В2, В6, В12, С, фолат).

[0539] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают полиамин. В некоторых вариантах осуществления, полиамин содержит путресцин. В некоторых вариантах осуществления, полиамин содержит спермидин. В некоторых вариантах осуществления, полиамин содержит спермин.

[0540] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают восстановитель. В некоторых вариантах осуществления, восстановитель содержит 2-меркаптоэтанол. В некоторых вариантах осуществления, восстановитель включает альфа-тиоглицерин. В некоторых вариантах осуществления, восстановитель содержит восстановленный глутатион.

[0541] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают защитную добавку. В некоторых вариантах осуществления, защитная добавка содержит карбоксиметилцеллюлозу. В некоторых

вариантах осуществления, защитная добавка содержит поливинилпирролидон. В некоторых вариантах осуществления, защитная добавка содержит плюроник F-68. В некоторых вариантах осуществления, защитная добавка содержит Tween 80.

[0542] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают фактор адгезии. В некоторых вариантах осуществления фактор адгезии содержит фибронектин. В некоторых вариантах осуществления, фактор адгезии содержит ламинин.

[0543] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов представляет собой один или несколько из одного или нескольких антиоксидантов, одного или нескольких видов альбумина или заменителей альбумина, одного или нескольких липидных средств, одного или нескольких видов инсулина или заменителя инсулина, одного или нескольких видов трансферрина или заменителей трансферрина, один или несколько микроэлементов и один или несколько глюкокортикоидов. В некоторых вариантах осуществления, антиоксиданты включают N-ацетил-L-цистеин, 2-меркаптоэтанол, или ацетат D, L-токоферола, или их производные или смеси. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой человеческий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, липидные средства включают Human Ex-Cyte® или этаноламин, или их производные и смеси. В некоторых вариантах осуществления, инсулин представляет собой человеческий инсулин цинка. В некоторых вариантах осуществления, трансферрин представляет собой насыщенный железом трансферрин человека. В некоторых вариантах осуществления, микроэлемент представляет собой Se⁴⁺. В некоторых вариантах осуществления, глюкокортикоид представляет собой гидрокортизон. В некоторых вариантах осуществления, добавка является концентрированной.

[0544] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов содержит один или несколько антиоксидантов, и один или несколько ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из одного или нескольких видов альбумина или заменителей альбумина, одного или нескольких липидных средств, одного или нескольких видов инсулина или заменителей инсулина, одного или нескольких видов трансферрина или заменителей трансферрина, одного или нескольких микроэлементов и одного или нескольких глюкокортикоидов.

[0545] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов содержит один или несколько из N-ацетил-L-цистеина, человеческого сывороточного альбумина, Human Ex-Cyte®, этаноламина, человеческого инсулина цинка, насыщенного железом трансферрина человека, Se⁴⁺, гидрокортизона, ацетата D, L-токоферола и/или 2-меркаптоэтанола.

[0546] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают N-ацетил-L-цистеин (NAC). В некоторых вариантах осуществления, концентрация NAC является такой, что после объединения добавки с базовой средой (такой как описанные в настоящем описании), концентрация

приблизительно 0 мг/л до точно или приблизительно 16 мг/л, от точно или приблизительно 0 мг/л до точно или приблизительно 18 мг/л, от точно или приблизительно 0 мг/л до точно или приблизительно 20 мг/л, от точно или приблизительно 0 мг/л до точно или приблизительно 22 мг/л, от точно или приблизительно 0 мг/л до точно или приблизительно 24 мг/л, от точно или приблизительно 0 мг/л до точно или приблизительно 26 мг/л, от точно или приблизительно 0 мг/л до точно или приблизительно 28 мг/л, от точно или приблизительно 0 мг/л до точно или приблизительно 30 мг/л.

[0549] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов можно предоставлять посредством добавления одной или нескольких добавок, таких как первая добавка и одна или несколько следующих или дополнительных добавок, в базовую среду.

[0550] В некоторых вариантах осуществления, первую добавку получают посредством добавления или смешивания L-глутамина с существующими добавками, содержащими один или несколько желательных компонентов. В некоторых вариантах осуществления, L-глутамин добавляют или смешивают с заменяющей сывороткой добавкой, например, заменителем сыворотки для иммуноцитов, например, ThermoFisher, #A2598101, или заменителем сыворотки для иммуноцитов CTS™. В некоторых вариантах осуществления, L-глутамин добавляют или смешивают с добавкой, которая включает заменитель сыворотки для иммуноцитов, описанный в Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31.

[0551] В некоторых вариантах осуществления, состав бессывороточной среды содержит точно или приблизительно 90%-98,75% (об./об.) базовой среды и точно или приблизительно 1,25%-10% (об./об.) первой добавки. В некоторых вариантах осуществления, состав бессывороточной среды содержит точно или приблизительно 90%-97,5% (об./об.) базовой среды и точно или приблизительно 1,25%-5% (об./об.) первой добавки. В некоторых вариантах осуществления, состав бессывороточной среды содержит точно или приблизительно 95% (об./об.) базовой среды и точно или приблизительно 2,5%±0,2% (об./об.) первой добавки, например, точно или приблизительно 2,5% (об./об.). В некоторых вариантах осуществления, литр базовой среды дополняют точно или приблизительно 25 миллилитрами первой добавки.

[0552] В некоторых вариантах осуществления, следующую добавку, например, вторую добавку, объединяют с базовой средой для предоставления одного или нескольких дополнительных компонентов. В некоторых вариантах осуществления, вторая добавка содержит один или несколько дополнительных компонентов, таких как любые, описанные выше, включая один или несколько антиоксидантов, один или несколько видов альбумина или заменителей альбумина, одно или несколько липидных средств, один или несколько видов инсулина или заменителей инсулина, один или несколько видов трансферрина или заменителей трансферрина, один или несколько микроэлементов и один или несколько глюкокортикоидов. Иллюстративные компоненты второй добавки описаны выше. В

некоторых вариантах осуществления, вторая добавка содержит альбумин, N-ацетилцистеин (NAC) и этаноламин. В некоторых вариантах осуществления, вторая добавка содержит альбумин, N-ацетилцистеин (NAC) и этаноламин, где концентрация альбумина, NAC и/или этаноламина является такой, что после объединения второй добавки с базовой средой (такой как описанные в настоящем описании), концентрация альбумина, NAC и/или этаноламина является по существу такой же, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой полученный от человека альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой полученный от человека альбумин из плазмы или сыворотки человека. В некоторых вариантах осуществления, вторая добавка представляет собой жидкость и не включает, или не включает значительное количество свободной формы глутамин (т.е., L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления, вторая добавка содержит добавку OpTmizer® (ThermoFisher, компонент A1048503).

[0553] В некоторых вариантах осуществления, вторая добавка является жидкой. В некоторых вариантах осуществления, вторая добавка не является замороженной или не рекомендована к замораживанию для хранения. В некоторых вариантах осуществления, состав бессывороточной среды содержит приблизительно 1,25%-5% (об./об.) второй добавки, например, точно или приблизительно $2,5\% \pm 0,2\%$, например, точно или приблизительно 2,5% или 2,6%. В некоторых вариантах осуществления, литр базовой среды дополняют приблизительно 26 миллилитрами второй добавки. В некоторых вариантах осуществления, состав бессывороточной среды содержит точно или приблизительно 90%-97,5% (об./об.) базовой среды и точно или приблизительно 1,25%-5% (об./об.) второй добавки. В некоторых вариантах осуществления, состав бессывороточной среды содержит точно или приблизительно 95% (об./об.) базовой среды и точно или приблизительно $2,5\% \pm 0,2\%$ (об./об.) второй добавки, например, точно или приблизительно 2,5% (об./об.) или 2,6% (об./об.). В некоторых вариантах осуществления, литр базовой среды дополняют точно или приблизительно 25 миллилитрами или 26 миллилитрами второй добавки.

[0554] В некоторых вариантах осуществления, как первую добавку (например, заменяющую сыворотку добавку, например, заменитель сыворотки для иммунцитов STS™), так и следующую добавку (например, добавку для клеток OpTmizer®), добавляют в базовую среду. В некоторых вариантах осуществления, состав бессывороточной среды содержит приблизительно 90%-97,5% (об./об.) базовой среды, приблизительно 1,25%-5% (об./об.) первой добавки и приблизительно 1,25%-5% (об./об.) второй добавки. В некоторых вариантах осуществления, состав бессывороточной среды содержит приблизительно 95% (об./об.) базовой среды, приблизительно $2,5\% \pm 0,2\%$ (об./об.) первой добавки и приблизительно $2,5\% \pm 0,2\%$ (об./об.) второй добавки.

[0555] В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько добавок концентрируют в от точно или приблизительно 2 до точно или приблизительно 100 раз. В некоторых вариантах осуществления, добавка представляет собой точно или

приблизительно 40X состав. В некоторых вариантах осуществления, литр базовой среды дополняют точно или приблизительно 20-30 миллилитрами, например, 25 ± 2 миллилитрами, по меньшей мере одной добавки, включая первую добавку и, в некоторых случаях, одну или несколько следующих добавок.

С. Бессывороточные среды

[0556] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду и синтетическую аминокислоту (например, дипептидную форму L-глутамина, например, L-аланил-L-глутамин), свободную форму глутамина (т.е., L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду и синтетическую аминокислоту (например, дипептидную форму L-глутамина, например, L-аланил-L-глутамин), свободную форма глутамина (т.е., L-глутамина). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточные среды дополнительно содержат по меньшей мере один белок или дополнительный компонент, например, чтобы способствовать поддержанию Т-клетки в ходе проверенного способа получения модифицированных Т-клеток.

[0557] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой форму, содержащую синтетическую аминокислоту (например, дипептидную форму L-глутамина, например, L-аланил-L-глутамин), которая является способной к превращению в свободную форму глутамина (т.е., L-глутамин) в культуре клеток, содержащей клетку, где среда является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая аминокислота является растворимой в водном растворе (например, бессывороточной среде). В некоторых вариантах осуществления, растворимость синтетической аминокислоты в водном растворе выше, чем свободной формы глутамина (т.е., L-глутамина). В некоторых вариантах осуществления, концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в бессывороточных средах составляет точно или приблизительно 0,5 мМ-5 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в бессывороточных средах составляет точно или приблизительно 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) составляет точно или приблизительно 0,5 мМ-1 мМ, 0,5 мМ-1,5 мМ, 0,5 мМ-2 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-4 мМ, 0,5 мМ-4,5 мМ, или 0,5 мМ-5 мМ, включая каждую. В некоторых вариантах осуществления, концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в бессывороточных средах составляет по меньшей мере точно или приблизительно 0,5 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация дипептидной формы L-глутамина, такой как L-аланил-L-глутамин, в бессывороточных средах составляет точно или приблизительно 2 мМ, и концентрация свободной формы L-глутамина в бессывороточных средах составляет точно или приблизительно 2 мМ.

[0558] В некоторых вариантах осуществления, концентрация свободной формы глутамин (т.е., L-глутамин) в бессывороточных средах составляет приблизительно 0,5 мМ-5 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация свободной формы глутамин (т.е., L-глутамин) в бессывороточных средах составляет точно или приблизительно 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация свободной формы глутамин (т.е., L-глутамин) в бессывороточных средах составляет точно или приблизительно 0,5 мМ-1 мМ, 0,5 мМ-1,5 мМ, 0,5 мМ-2 мМ, 0,5 мМ-2,5 мМ, 0,5 мМ-3 мМ, 0,5 мМ-3,5 мМ, 0,5 мМ-4 мМ, 0,5 мМ-4,5 мМ или 0,5 мМ-5 мМ, включая каждую. В некоторых вариантах осуществления, концентрация свободной формы глутамин (т.е., L-глутамин) в средах составляет по меньшей мере точно или приблизительно 0,5 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ, или 5 мМ.

[0559] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит по меньшей мере один белок. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок не имеет происхождения, отличного от млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок является человеческим или происходящим из человеческого. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов включают по меньшей мере один белок. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок не имеет происхождения, отличного от млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок является человеческим или происходящим из человеческого. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один белок включает альбумин, трансферрин, инсулин, фибронектин, апротинин или фетуин. В некоторых вариантах осуществления, белок содержит один или несколько из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно, один или несколько из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

[0560] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин получен от человека. В некоторых вариантах осуществления, альбумин получен из сыворотки человека или плазмы человека. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный альбумин происходит из человеческого. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный альбумин не происходит из человеческого. В некоторых вариантах осуществления, добавка содержит природный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, природный альбумин получен от человека. В некоторых вариантах осуществления, природный альбумин не получен от человека. В некоторых вариантах осуществления, концентрация альбумина в бессывороточных средах составляет от точно или приблизительно 0 мг/мл до точно или приблизительно 2 мг/мл, от точно или приблизительно 0 мг/мл до точно или приблизительно 4 мг/мл, от точно или

приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 650 мг/л, или от точно или приблизительно 10 мг/л до точно или приблизительно 750 мг/л. В некоторых вариантах осуществления, концентрация трансферрина в бессывороточных средах составляет точно или приблизительно 100 мг/л. В некоторых вариантах осуществления, концентрация трансферрина в бессывороточных средах составляет точно или приблизительно 50 мг/л-150 мг/л.

[0562] В некоторых вариантах осуществления, добавка содержит инсулин или заменитель инсулина (такие как описано в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления, инсулин получен от человека. В некоторых вариантах осуществления, инсулин представляет собой рекомбинантный инсулин. В некоторых вариантах осуществления, инсулин представляет собой рекомбинантный инсулин человека. В некоторых вариантах осуществления, концентрация инсулина (или заменителя инсулина) в бессывороточных средах составляет от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 2,5 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 5 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 7,5 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 10 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 12,5 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 15 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 17,5 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 20 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 22,5 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 25 мг/л, от точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 27,5 мг/л, или точно или приблизительно 1 мг/л до точно или приблизительно 30 мг/л. В некоторых вариантах осуществления, концентрация инсулина или заменителя инсулина в бессывороточных средах составляет точно или приблизительно 10 мг/л. В некоторых вариантах осуществления, концентрация инсулина или заменителя инсулина в бессывороточных средах составляет от точно или приблизительно 7,5 мг/л до точно или приблизительно 12,5 мг/л.

[0563] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда не содержит фенол красный. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит фенол красный.

[0564] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит смесь питательных веществ из неорганических солей, сахаров, аминокислот, необязательно, также содержащую витамины, органические кислоты, антиоксиданты, липиды, факторы роста, N-ацетилцистеин, этаноламин и/или буферы. Примеры включают описанные в настоящем описании, например, в разделе выше, включая неорганические соли, сахара, аминокислоты, витамины, органические кислоты, антиоксиданты, липиды, факторы роста, N-ацетилцистеин, этаноламин и/или буферы.

[0565] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит один или несколько ингредиентов, выбранных из одного или нескольких из одного или нескольких антиоксидантов, одного или нескольких видов альбумина или заменителей альбумина, одного или нескольких липидных средств, одного или нескольких видов инсулина или заменителей инсулина, одного или нескольких видов трансферрина или заменителей трансферрина, одного или нескольких микроэлементов, одного или нескольких глюкокортикоидов, одной или нескольких неорганических солей, одного или нескольких источников энергии, одного или нескольких буферизующих средств, одной или нескольких солей пируватов, одного или нескольких индикаторов pH, одной или нескольких аминокислот и одного или нескольких витаминов. В некоторых вариантах осуществления, антиоксиданты выбраны из группы, состоящей из N-ацетил-L-цистеина, 2-меркаптоэтанола и ацетата D, L-токоферола, или их производных или смесей. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой человеческий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, липидные средства представляют собой Human Ex-Cyte® и этаноламин. В некоторых вариантах осуществления, инсулин представляет собой человеческий инсулин цинка. В некоторых вариантах осуществления, трансферрин представляет собой насыщенный железом трансферрин человека. В некоторых вариантах осуществления, глюкокортикоид представляет собой гидрокортизон. В некоторых вариантах осуществления, ингредиент неорганической соли содержит одну или несколько неорганических солей, выбранный из группы, состоящей из одной или нескольких солей кальция, одной или нескольких солей калия, одной или нескольких солей магния, одной или нескольких солей натрия, одной или нескольких солей карбонатов и одной или нескольких солей фосфатов. В некоторых вариантах осуществления, источник энергии представляет собой D-глюкозу. В некоторых вариантах осуществления, буферизующее средство представляет собой HEPES. В некоторых вариантах осуществления, соль пируват представляет собой пируват натрия. В некоторых вариантах осуществления, индикатор pH представляет собой фенол красный. В некоторых вариантах осуществления, ингредиент аминокислоты содержит одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из глицина, L-аланина, L-аспарагина, L-цистеина, L-аспарагиновой кислоты, L-глутаминовой кислоты, L-фенилаланина, L-гистидина, L-изолейцина, L-лизина, L-лейцина, L-глутамина, L-аргинина HCl, L-метионина, L-пролина, L-гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина и L-валина, и их солей и производных. В некоторых вариантах осуществления, ингредиент витамина содержит один или несколько витаминов, выбранных из группы, состоящей из биотина, D-пантотената кальция, хлорида холина, фолиевой кислоты, i-инозитола, ниацинамида, пиридоксала HCl, рибофлавина, тиамин HCl и витамина B12, и их производных. В некоторых вариантах осуществления, ингредиенты содержат N-ацетил-L-цистеин, 2-меркаптоэтанол, человеческий сывороточный альбумин, ацетат D, L-токоферола, Human Ex-Cyte®, этаноламин, человеческий инсулин цинка, насыщенный железом трансферрин, Se⁴⁺, гидрокортизон, Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Na⁺, CO₃²⁻, PO₄³⁻, D-

глюкоза, NEPES, пируват натрия, фенол красный, глицин, L-аланин, L-аспарагин, L-цистеин, L-аспарагиновую кислоту, L-глутаминовую кислоту, L-фенилаланин, L-гистидин, L-изолейцин, L-лизин, L-лейцин, L-глутамин, L-аргинин HCl, L-метионин, L-пролин, L-гидроксипролин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, L-тирозин и L-валин, биотин, D-пантотенат кальция, холин хлорид, фолиевую кислоту, i-инозитол, ниацинамид, пиридоксаль HCl, рибофлавин, тиамин HCl и витамин B12.

[0566] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к бессывороточным средам, содержащим базовую среду и по меньшей мере одну добавку. Различные примеры базовых сред и добавок описаны в настоящем описании, например, в разделе выше.

[0567] В некоторых вариантах осуществления, состав бессывороточной среды содержит от точно или приблизительно 90% до точно или приблизительно 97,5% (об./об.) базовой среды, от точно или приблизительно 2,5% до точно или приблизительно 10% (об./об.) добавки, например, первой добавки и/или второй добавки. В некоторых вариантах осуществления, состав бессывороточной среды содержит от точно или приблизительно 90% до точно или приблизительно 97,5% (об./об.) базовой среды, от точно или приблизительно 1,25% до точно или приблизительно 5% (об./об.) первой добавки, и от точно или приблизительно 1,25% до точно или приблизительно 5% (об./об.) второй добавки.

[0568] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду, такую как базовая среда для размножения T-клеток OpTmizer™ (ThermoFisher), дополненная одной или несколькими добавками. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько добавок является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду, дополненную добавкой для поддержания активации клетки (например, T-клетки), такой как добавка для размножения T-клеток OpTmizer™ (ThermoFisher). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит свободную форму аминокислоты, такую как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда не содержит рекомбинантный цитокин, такой как один или несколько из рекомбинантного IL-2 человека, рекомбинантного IL-7 человека и/или рекомбинантного IL-15 человека. В конкретных вариантах осуществления, бессывороточные среды можно использовать в любой одной или нескольких стадиях способа, описанного в настоящем описании, таких как одна или несколько стадий, описанных в разделе I. В некоторых вариантах осуществления, например, бессывороточную среду используют в ходе инкубации и/или сбора, накопления или составления клеток.

[0569] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду, дополненную добавкой для T-клеток и свободной формой L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду для размножения T-клеток OpTmizer™, дополненную добавкой для размножения T-клеток

OpTmizer™ и L-глутамином. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду для размножения Т-клеток OpTmizer™, дополненную приблизительно 2,6% добавки для размножения Т-клеток OpTmizer™, и приблизительно 1,0% L-глутамин (приблизительно 2 мМ в конечной концентрации). В некоторых вариантах осуществления, такие бессывороточная среда не содержит рекомбинантный цитокин, такой как один или несколько из рекомбинантного ИЛ-2 человека, рекомбинантного ИЛ-7 человека и/или рекомбинантного ИЛ-15 человека. В конкретных вариантах осуществления, бессывороточные среды можно использовать в любой одной или нескольких стадиях способа, описанного в настоящем описании, таких как одна или несколько стадий, описанных в разделе I. В некоторых вариантах осуществления, например, бессывороточную среду используют в ходе инкубации и/или сбора, накопления или составления клеток.

[0570] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду, дополненную добавкой для поддержания активации клетки (например, Т-клетки), такой как добавка для размножения Т-клеток OpTmizer™ (ThermoFisher), и дополнительно содержит заменяющую сыворотку добавку, например, заменитель сыворотки для иммунцитов, например, ThermoFisher, #A2596101, заменитель сыворотки для иммунцитов CTST™ или заменитель сыворотки для иммунцитов описанный в Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит свободную форму аминокислоты, такую как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит дипептидную форму L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин), такую как дипептид в Glutamax™ (ThermoFisher). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит один или несколько цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов связывают и/или являются способными связывать рецепторы, которые экспрессируются Т-клетками и/или являются эндогенными для Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают член семейства цитокинов с 4-альфа-спиральным пучком. В некоторых вариантах осуществления, члены семейства цитокинов с 4-альфа-спиральным пучком включают, но без ограничения, интерлейкин-2 (ИЛ-2), интерлейкин-4 (ИЛ-4), интерлейкин-7 (ИЛ-7), интерлейкин-9 (ИЛ-9), интерлейкин 12 (ИЛ-12), интерлейкин 15 (ИЛ-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит один или несколько из рекомбинантного ИЛ-2 человека, рекомбинантного ИЛ-7 человека и/или рекомбинантного ИЛ-15 человека. В конкретных вариантах осуществления, бессывороточные среды можно использовать в любой одной или нескольких стадиях способа, описанного в настоящем описании, таких как одна или несколько стадий, описанных в разделе I. В конкретных

вариантах осуществления, бессывороточные среды можно использовать в любой одной или нескольких стадиях, включающих получение образца, отбор, стимуляцию и/или модификацию.

[0571] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду, дополненную добавкой для Т-клеток, заменителем сыворотки для иммуноцитов, свободной формой L-глутамина, дипептидной формой L-глутамина, рекомбинантным IL-2, рекомбинантным IL-7 и/или рекомбинантным IL-15. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду для размножения Т-клеток OpTmizer™, дополненную добавкой для размножения Т-клеток OpTmizer™, заменителем сыворотки для иммуноцитов STS™, L-глутамином, L-аланил-L-глутамином, рекомбинантным IL-2 человека, рекомбинантным IL-7 человека и рекомбинантным IL-15 человека. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит базовую среду для размножения Т-клеток OpTmizer™, дополненную приблизительно 2,6% добавки для размножения Т-клеток OpTmizer™, приблизительно 2,5% заменителя сыворотки для иммуноцитов STS™, приблизительно 1,0% L-глутамина (приблизительно 2 мМ в конечной концентрации), приблизительно 1,0% L-аланил-L-глутамина (приблизительно 2 мМ в конечной концентрации), приблизительно 100 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 человека, приблизительно 600 МЕ/мл рекомбинантного IL-7 человека и приблизительно 100 МЕ/мл рекомбинантного IL-15 человека. В конкретных вариантах осуществления, бессывороточные среды можно использовать в любой одной или нескольких стадиях способа, описанного в настоящем описании, таких как одна или несколько стадий, описанных в разделе I. В конкретных вариантах осуществления, бессывороточные среды можно использовать в любой одной или нескольких стадиях, включающих получение образца, отбор, стимуляцию и/или модификацию.

[0572] В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой концентрированный состав среды. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой неконцентрированный состав среды. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда является концентрированной от точно или приблизительно 2X до точно или приблизительно 100X. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой точно или приблизительно 10X состав. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточные среды можно хранить при точно или приблизительно 2°C-8°C.

IV. РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ

[0573] В некоторых вариантах осуществления, клетки, обработанные, переработанные, модифицированные и/или продуцированные способами, представленными в настоящем описании, содержат или экспрессируют, или модифицированы для содержания или экспрессии, рекомбинантного белка, такого как рекомбинантный рецептор, например, химерный рецептор антигена (CAR), или Т-клеточный рецептор (TCR). В конкретных вариантах осуществления, способами,

представленными в настоящем описании, получают и/или обеспечивают возможность получения клеток, или популяций или композиций, содержащих клетки и/или обогащенных клетками, модифицированными для экспрессии/или содержания рекомбинантного белка. В различных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к модифицированным, трансформированным, трансдуцированным или трансфицированным клеткам, таким как иммунциты, такие как Т-клетки, которые экспрессируют один или несколько рекомбинантных белок(белки). В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере один из одного или нескольких рекомбинантных белков представляет собой рекомбинантный рецептор, например, рецепторы антигенов и рецепторы, содержащие один или несколько их компонентов.

А. Рекомбинантные рецепторы

[0574] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к модифицированным клеткам, таким как иммунциты, такие как Т-клетки, экспрессирующие один или несколько рекомбинантных рецептор(ов). Среди рецепторов присутствуют рецепторы антигенов и рецепторы, содержащие один или несколько 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 несколькими 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.

1. Химерные рецепторы антигенов (CAR)

[0575] В некоторых вариантах осуществления представленных способов, химерные рецепторы, такие как химерные рецепторы антигенов, содержат один или несколько доменов, которые объединяют лигандсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), обеспечивающий специфичность для желательного антигена (например, антигена опухоли) с внутриклеточным передающим сигналами доменом. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен представляет собой часть активирующего внутриклеточного домена, такого как Т-клеточный активирующий домен, обеспечивающий первичный сигнал активации. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен

содержит или дополнительно содержит костимулирующий передающий сигналы домен, чтобы способствовать эффекторным функциям. В некоторых вариантах осуществления, химерные рецепторы, при генетической модификации иммунцитов с их помощью, могут модулировать активность Т-клеток, и, в некоторых случаях, могут модулировать дифференцировку или гомеостаз Т-клеток, таким образом, с получением генетически модифицированных клеток с улучшенной продолжительностью жизни, выживаемостью и/или персистенцией *in vivo*, например, для использования в способах адоптивной клеточной терапии.

[0576] Иллюстративные рецепторы антигенов, включая CAR, и способы модификации и введения таких рецепторов в клетки, включают описанные, например, в Публикациях международных патентных заявок номера WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, Публикациях патентных заявок США номера US2002131960, US2013287748, US20130149337, Патентах США No.: 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353 и 8479118, и Европейской патентной заявке номер EP2537416, и/или описанные в Sadelain et al., *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., *Cancer*, 2012 March 18(2): 160-75. В некоторых аспектах, рецепторы антигенов включают CAR, как описано в Патенте США No.: 7446190, и описанные в Публикации международной патентной заявки No.: WO/2014055668 A1. Примеры CAR включают CAR, как описано в любой из вышеупомянутых публикаций, таких как WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, Патент США No.: 7446190, Патент США No.: 8389282, Kochenderfer et al., 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; и Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177). См. также WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, Патент США No.: 7446190 и Патент США No.: 8389282.

[0577] Химерные рецепторы, такие как CAR, как правило, включают внеклеточный антигенсвязывающий домен, такой как часть молекулы антитела, как правило, область вариабельной тяжелой (VH) цепи и/или область вариабельной легкой (VL) цепи антитела, например, фрагмент scFv антитела.

[0578] В некоторых вариантах осуществления, антиген, на который нацелен рецептор, представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления, он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, антиген избирательно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках, пораженных заболеванием или состоянием, например, клетки опухоли или патогенные клетки, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления, антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на модифицированных клетках.

[0579] В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой или включает интегрин $\alpha\nu\beta 6$ (интегрин $\alpha\nu\beta 6$), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раково/тестикулярный антиген, раково/тестикулярный антиген 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, лиганд 1 хемокинов с мотивом C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4), белок эпидермальный фактор роста (EGFR), рецептор эпидермального фактора роста с мутацией типа III (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин B2, рецептор эфрина A2 (EPHa2), рецептор эстрогена, подобный рецептору Fc белок 5 (FCRL5; также известный как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетальный рецептор ацетилхолина (фетальный AchR), связывающий фолат белок (FBP), рецептор-альфа фолата, ганглиозид GD2, O-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 A1 (HLA-A1), человеческий лейкоцитарный антиген A2 (HLA-A2), рецептор альфа IL-22 (IL-22R α), 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 A семейства 8, содержащего богатые лейцином повторы (LRRC8A), Lewis Y, ассоциированный с меланомой антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), с-Met, мышинный цитомегаловирус (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды члена D группы 2 естественных киллеров (NKG2D), мелан А (MART-1), молекулу адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетальный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простатспецифический 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. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой вирусный антиген (например, вирусный антиген из HIV, HCV, HBV и т.д.), бактериальные антигены и/или паразитарные антигены.

[0580] В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, такой как scFv, который включает один или несколько линкеров, соединяющих два домена или области антитела, таких как переменная область тяжелой цепи (V_H) и переменная область легкой цепи (V_L). Линкер, как правило, представляет собой пептидный линкер, например, гибкий и/или растворимый пептидный линкер. Среди линкеров присутствуют линкеры, богатые глицином и серином, и/или, в некоторых случаях, треонином. В некоторых вариантах осуществления, линкеры дополнительно включают заряженные остатки, такие как лизин и/или глутамат, которые могут улучшать растворимость. В некоторых вариантах осуществления, линкеры дополнительно включают один или несколько остатков пролина. В некоторых аспектах, линкеры, богатые глицином и серином (и/или треонином) включают по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% такой аминокислоты(аминокислот). В некоторых вариантах осуществления, они включают по меньшей мере точно или приблизительно 50%, 55%, 60%, 70% или 75%, глицина, серина и/или треонина. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит по существу полностью из глицина, серина и/или треонина. Линкеры, как правило, имеют длину между приблизительно 5 и приблизительно 50 аминокислот, как правило, между точно или приблизительно 10 и точно или приблизительно 30, например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, и в некоторых примерах, длину между 10 и 25 аминокислот. Иллюстративные линкеры включают линкеры, имеющие различные количества повторов последовательности GGGGS (4GS; SEQ ID NO: 122) или GGGG (3GS; SEQ ID NO: 123), например, между 2, 3, 4 и 5 повторами такой последовательности. Иллюстративные линкеры включают линкеры, имеющие или состоящие из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 79 (GGGGSGGGSGGGGS), SEQ ID NO: 62 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG) или SEQ ID NO: 124 (SRGGGGSGGGSGGGGSLEMA).

[0581] Антигены, на которые нацелены рецепторы, в некоторых вариантах осуществления, включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любой из ряда известных маркеров В-клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген, на который нацелен рецептор, представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig каппа, Ig лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

[0582] В некоторых вариантах осуществления, антиген или связывающий домен антигена представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит VH и VL, происходящие из антитела или фрагмента антитела, специфических для CD19. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, которые связывают CD19, представляют собой происходящее из мыши антитело, такое как FMC63 и SJ25C1. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела представляет собой человеческое антитело, например, как описано в Публикации патента США No. US 2016/0152723.

[0583] Термин «антитело» использован в настоящем описании в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая фрагменты антигенсвязывающих (Fab) фрагментов, фрагменты F(ab')₂, фрагменты Fab', фрагменты Fv, фрагменты рекомбинантного IgG (rIgG), переменные области тяжелой цепи (V_H), способные специфически связывать антиген, одноцепочечные фрагменты антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), и однодоменные антитела (например, sdAb, sdFv, нанотело). Термин включает генетически модифицированные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интраантитела, пептидные антитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, мультиспецифические, например, биспецифические или триспецифические, антитела, диатела, триатела и тетраатела, тандемный ди-scFv, тандемный три-scFv. Если не указано иное, термин «антитело» следует понимать как включающий их функциональные фрагменты антител, также обозначенный в настоящем описании как «антигенсвязывающие фрагменты». Термин включает также интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы, IgM, IgE, IgA, и IgD.

[0584] Термины «определяющая комплементарность область» и «CDR», синонимические с «гипервариабельная область» или «HVR», известны в данной области для обозначения не являющихся непрерывными последовательностей аминокислот в переменных областях антитела, придающих специфичность и/или аффинность связывания антигена. Как правило, присутствуют три CDR в каждой переменной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой переменной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). «Каркасные области» и «FR» известны в данной области для обозначения не относящихся к CDR частей переменных областей тяжелой и легкой цепей. Как правило, присутствуют четыре FR в каждой полноразмерной переменной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3, и FR-H4), и четыре FR в каждой полноразмерной переменной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3, и FR-L4).

[0585] Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR или FR можно легко определять с использованием любой из ряда хорошо известных схем,

включая описанные в Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации «Kabat»); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации «Chothia»); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), «Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography», J. Mol. Biol. 262, 732-745». («контактная» схема нумерации); Lefranc MP et al., «IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains», Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации «IMGT»); Honegger A and Plückthun A, «Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool», J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (схема нумерации «Aho»); и Martin et al., «Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm», PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (схема нумерации «AbM»).

[0586] Границы данной CDR или FR могут меняться, в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Kabat основана на выравниваниях структуры, в то время как схема Chothia основана на структурной информации. Нумерация для обеих схем Kabat и Chothia основана на наиболее распространенной длине последовательностей областей антитела, с вставками, размещенными посредством вставки букв, например, «30a», и делециями, возникающими в некоторых антителах. Эти две схемы помещают определенные вставки и делеции («инделы») в различные положения, что приводит к различной нумерации. Контактная схема основана на анализе кристаллических структур комплексов и является во многих отношениях сходной со схемой нумерации Chothia. Схема AbM представляет собой компромисс между определениями Kabat и Chothia, на основании того, что используют в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular.

[0587] В **таблице 1**, ниже, перечислены иллюстративные границы положений CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, как идентифицировано посредством схем Kabat, Chothia, AbM и контактной схемы, соответственно. Для CDR-H1, нумерация остатков перечислена с использованием обеих схем нумерации Kabat и Chothia. FR локализованы между CDR, например, с FR-L1, локализованной перед CDR-L1, FR-L2, локализованной между CDR-L1 и CDR-L2, FR-L3, локализованной между CDR-L2 и CDR-L3, и т.д. Следует отметить, что поскольку показанная схема нумерации Kabat помещает вставки в H35A и H35B, конец петли CDR-H1 Chothia при нумерации с использованием показанного правила нумерации Kabat меняется между H32 и H34, в зависимости от длины петли.

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

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

CDR-H1 (Нумерация Chothia ²)	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

1 - Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

2 - Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948

[0588] Таким образом, если не указано иное, «CDR» или «определяющая комплементарность область», или индивидуально указанные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), данного антитела или его области, такой как его переменная область, следует понимать как включающие некоторую (или конкретную) определяющую комплементарность область, как определено посредством любой из вышеупомянутых схем, или других известных схем. Например, где указано, что конкретная CDR (например, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в аминокислотной последовательности данной области V_H или V_L , понятно, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (например, CDR-H3) внутри переменной области, как определено посредством любой из вышеупомянутых схем, или других известных схем. В некоторых вариантах осуществления, указаны конкретные последовательности CDR. Иллюстративные последовательности CDR представленных антител описаны с использованием различных схем нумерации, хотя понятно, что представленное антитело может включать CDR, как описано в соответствии с любой из других вышеупомянутых схем нумерации или других схем нумерации, известных специалисту в данной области.

[0589] Подобным образом, если не указано иное, некоторую FR или индивидуальные указанные FR(несколько FR) (например, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4), данного антитела или его области, таких как его переменная область, следует понимать как включающие некоторую (или конкретную) каркасную область, как определено посредством любой из известных схем. В некоторых случаях, указана схема для идентификации конкретных CDR, FR, или нескольких FR или CDR, например, CDR, как определено посредством способа Kabat, Chothia, AbM или контактного способа, или других известных схем. В других случаях, приведена конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

[0590] Термин «переменная область» или «переменный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, вовлеченному в связывание антитела с антигеном. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L , соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, где каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три CDR. (См., например, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007). Один домен V_H или V_L может являться достаточным для обеспечения специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, связывающие конкретный антиген, можно выделять с использованием домена V_H или V_L из антитела, которое связывается с антигеном, для

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

[0591] Среди антител, включенных в представленные CAR, присутствуют фрагменты антител. «Фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но без ограничения, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; переменные области тяжелой цепи (V_H), одноцепочечные молекулы антител, такие как scFv и однодоменные антитела, содержащие только область V_H ; и мультиспецифические антитела, сформированные из фрагментов антител. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен в представленных CAR представляет собой или содержит фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H) и переменную область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления, антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие переменную область тяжелой цепи (V_H) и/или переменную область легкой цепи (V_L), такие как scFv.

[0592] В некоторых вариантах осуществления, scFv происходит из FMC63. FMC63 в общем относится к мышинному моноклональному антителу IgG1, образованному против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., et al. (1987). *Leucocyte typing III.* 302). В некоторых вариантах осуществления, антитело FMC63 содержит CDRH1 и H2, указанные в SEQ ID NO: 51 и 52, соответственно, и CDRH3, указанную в SEQ ID NO: 53 или 54, и CDRL1, указанную в SEQ ID NO: 55, и CDR L2, указанную в SEQ ID NO: 55 или 57, и CDR L3, указанную в SEQ ID NO: 58 или 59. В некоторых вариантах осуществления, антитело FMC63 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 60, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 61.

[0593] В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDRL1 из SEQ ID NO: 55, последовательность CDRL2 из SEQ ID NO: 56 и последовательность CDRL3 из SEQ ID NO: 58, и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDRH1 из SEQ ID NO: 51, последовательность CDRH2 из SEQ ID NO: 52 и последовательность CDRH3 из SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO:60, и переменную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO:61. В некоторых вариантах осуществления, переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, линкер указан в SEQ ID NO: 62. 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: 63 или последовательностью, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 64 или последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:64.

[0594] В некоторых вариантах осуществления scFv происходит 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). В некоторых вариантах осуществления, антитело SJ25C1 содержит последовательности CDRH1, H2 и H3, указанные в SEQ ID NO: 65-67, соответственно, и последовательности CDRL1, L2 и L3, указанные в SEQ ID NO:68-70, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, антитело SJ25C1 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 71, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72.

[0595] В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDRL1 из SEQ ID NO:73, последовательность CDRL2 из SEQ ID NO: 74, и последовательность CDRL3 из SEQ ID NO:75, и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDRH1 из SEQ ID NO:76, последовательность CDRH2 из SEQ ID NO:77 и последовательность CDRH3 из SEQ ID NO:78. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 71 и переменную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO:72. В некоторых вариантах осуществления, переменная тяжелая и переменная легкая цепь соединены посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, линкер указан в SEQ ID NO:79. 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:80, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:80.

[0596] В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv или домен V_H) специфически узнает антиген, такой как ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент происходит из, или является вариантом, антител или антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают ВСМА.

[0597] В некоторых вариантах осуществления, CAR представляет собой CAR против ВСМА, который является специфическим для ВСМА, например, ВСМА человека. Химерные рецепторы антигенов, содержащие антитела против ВСМА, включая антитела мыши против ВСМА человека и антитела человека против ВСМА человека, и клетки, экспрессирующие такие химерные рецепторы, описаны ранее. См. Carpenter et al., Clin Cancer Res., 2013, 19(8):2048-2060, WO 2016/090320, WO2016090327, WO2010104949A2 и WO2017173256. В некоторых вариантах осуществления, антиген или связывающий домен антигена представляет собой ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L, происходящие из антитела или фрагмента антитела, специфических для ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, которое связывает ВСМА, представляет собой или содержит V_H и V_L из антитела или фрагмента антитела, указанных в Международных патентных заявках, номер публикации WO 2016/090327 и WO 2016/090320.

[0598] В некоторых вариантах осуществления, CAR против ВСМА содержит антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержащий переменную тяжелую (V_H) и/или переменную легкую (V_L) область, происходящую из антитела, описанного в WO 2016/090320 или WO2016090327. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H, указанную в SEQ ID NO: 116, и V_L, указанную в SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H, указанную в SEQ ID NO: 118, и V_L, указанную в SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H, указанную в SEQ ID NO: 120 и V_L, указанную в SEQ ID NO: 121. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H, указанную в SEQ ID NO: 113 и V_L, указанную в SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H, указанную в SEQ ID NO: 125, и V_L, указанную в SEQ ID NO: 126. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H, указанную в SEQ ID NO: 127, и V_L, указанную в SEQ ID NO: 128. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H, указанную в SEQ ID NO: 129 и V_L, указанную в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления, V_H или V_L имеет последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с любыми из вышеуказанных последовательностей V_H или V_L, и сохраняет связывание с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, область V_H является амино-концевой по отношению к области V_L. В некоторых вариантах осуществления, область V_H является карбокси-концевой по отношению к области V_L.

[0599] В некоторых вариантах осуществления, антиген или связывающий домен антигена представляет собой GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L, происходящие из антитела или фрагмента антитела, специфических

для GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, которое связывает GPRC5D, представляет собой или содержит VH и VL из антитела или фрагмента антитела, указанных в Международных патентных заявках, номер публикации WO 2016/090329 и WO 2016/090312.

[0600] 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), узнающей 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.

[0601] В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой или включает специфический для патогена или экспрессированный патогеном антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой вирусный антиген (такой как вирусный антиген из HIV, HCV, HBV и т.д.), бактериальные антигены, и/или паразитические антигены. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит TCR-подобное антитело, такое как антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), который 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 TCR-

подобный CAR. В некоторых вариантах осуществления, CAR представляет собой TCR-подобный CAR, и антиген представляет собой процессированный пептидный антиген, такой как пептидный антиген из внутриклеточного белка, который, подобно TCR, осуществляет узнавание на поверхности клетки в контексте молекулы МНС. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфический для комплекса МНС-пептид, из TCR-подобного CAR, соединен с одним или несколькими компонентами для передачи внутриклеточных сигналов, в некоторых аспектах, посредством линкеров и/или трансмембранного домена(доменов). В некоторых вариантах осуществления, такие молекулы могут, как правило, имитировать или приблизительно воспроизводить сигнал через природный рецептор антигена, такой как TCR, и, необязательно, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором.

[0602] 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 TCR-подобное антитело. Как правило, молекулы МНС класса I представляют собой гетеродимеры, имеющие трансмембранную α -цепь, в некоторых случаях, с тремя α -доменами, и нековалентно связанный β 2-микроглобулин. Как правило, молекулы МНС класса II состоят из двух трансмембранных гликопротеинов, α и β , оба из которых, как правило, пересекают мембрану. Молекула МНС может включать эффективный участок МНС, который содержит антигенсвязывающий участок или участки для связывания пептида, и последовательности, необходимые для узнавания соответствующим рецептором антигена. В некоторых вариантах осуществления, молекулы МНС класса I доставляют пептиды, образованные в цитозоле, к поверхности клетки, где комплекс МНС-пептид узнают Т-клетки, как правило, такие как $CD8^+$ Т-клетки, но, в некоторых случаях, $CD4^+$ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, молекулы МНС класса II доставляют пептиды, образованные в везикулярной системе, к поверхности клетки, где их, как правило, узнают $CD4^+$ Т-клетки. Как правило, молекулы МНС кодированы группой сцепленных локусов, совместно называемых H-2 у мыши и человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA) у человека. Таким образом, как правило, МНС человека может быть также обозначен, как человеческий лейкоцитарный антиген (HLA).

[0603] 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.

[0604] 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.

[0605] 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).

[0606] 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.

[0607] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связываются с комплексом МНС-пептид, можно получать с использованием способов дисплея библиотек антител, таких как фаговые библиотеки антител. В некоторых вариантах осуществления, можно получать библиотеки фагового дисплея для мутантного Fab, scFv или других форм антитела, например, в которых члены библиотеки мутированы в одном или нескольких остатках CDR или нескольких CDR. См., например, Публикацию патентной заявки США No. US20020150914, US20140294841; и Cohen CJ. et al. (2003) *J Mol. Recogn.* 16:324-332.

[0608] В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой CD20. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит VH и VL, происходящие из антитела или фрагмента антитела, специфических для CD20. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, которые связывают CD20, представляют собой антитело, которое представляет собой или происходит из ритуксимаба, такое как scFv ритуксимаба.

[0609] В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой CD22. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит VH и VL, происходящие из антитела или фрагмента антитела, специфических для CD22. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, которые связывают CD22, представляют собой антитело, которое представляет собой или происходит из m971, такое как scFv m971.

[0610] В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент антитела. В некоторых аспектах, химерный рецептор антигена включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, и внутриклеточный передающий сигналы домен. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент включает scFv.

[0611] В некоторых вариантах осуществления, часть антитела рекомбинантного рецептора, например, CAR, дополнительно включает по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, такую как шарнирная область, например, шарнирная область IgG4 и/или CH1/CL, и/или область Fc. В некоторых вариантах осуществления, константная область или фрагмент 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. Иллюстративные спейсеры включают, но без ограничения, спейсеры, описанные в Hudecek et al. (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, публикации международной патентной заявки номер WO2014031687, Патент США No. 8822647 или публикации патентной заявки No. US2014/0271635.

[0612] В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть происходит из IgG человека, такого как IgG4 или IgG1. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность ESKYGPPCPPCP (указанную в SEQ ID NO: 81), и кодирован последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть происходит из IgD. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 81, 83, 84 или 85. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, указанные в SEQ ID NO: 86-94. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 86-94.

[0613] В некоторых вариантах осуществления, рецептор антигена содержит внутриклеточный домен, связанный напрямую или опосредованно с внеклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена включает трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный передающий сигналы домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен содержит ITAM. Например, в некоторых аспектах, узнающий антиген домен (например, внеклеточный домен), как правило, связан с одним или несколькими внутриклеточными передающими сигналы компонентами, такими как передающие сигналы компоненты, имитирующие активацию посредством комплекса рецептора антигена, такого как комплекс TCR, в случае CAR, и/или сигнала через другой рецептор клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор содержит трансмембранный домен, связанный или слитый между внеклеточным доменом (например, scFv) и внутриклеточным передающим сигналы доменом. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий компонент (например, антитело) является связанным с одним или несколькими трансмембранными и внутриклеточными передающими сигналы доменами.

[0614] В одном варианте осуществления, используют трансмембранный домен, который естественным образом является ассоциированным с одним из доменов в рецепторе, например, CAR. В некоторых случаях, трансмембранный домен отбирают или модифицируют посредством аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами таких же или отличных поверхностных мембранных белков, для минимизации взаимодействий с другими членами рецепторного комплекса.

[0615] Трансмембранный домен, в некоторых вариантах осуществления, происходит либо из природного, либо из синтетического источника. Когда источник является природным, домен, в некоторых аспектах, происходит из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, происходящие из (т.е., содержащие по меньшей мере трансмембранную область(области) из) цепи альфа, бета или дзета Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Альтернативно, трансмембранный домен, в некоторых вариантах осуществления, является синтетическим. В некоторых аспектах, синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах, триплет из фенилаланина, триптофана и валина можно обнаружить на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, связывание осуществляют посредством линкеров, спейсеров и/или трансмембранного домена(доменов). В некоторых аспектах, трансмембранный домен содержит трансмембранную часть из CD28.

[0616] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен 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. В некоторых вариантах осуществления, рецептор содержит внеклеточную часть молекулы, из которой происходит трансмембранный домен, такую как внеклеточная часть CD28.

[0617] Среди внутриклеточных передающих сигналы доменов присутствуют домены, имитирующие или приблизительно воспроизводящие сигнал через природный рецептор антигена, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором, и/или сигнал через костимулирующий рецептор отдельно. В некоторых вариантах осуществления, короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной между 2 и 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий остатки глицина и серина, например, дуплет глицин-серин, присутствует и формирует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим передающим сигналы доменом CAR.

[0618] 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 последовательности), и последовательностями, которые действуют независимо от антигена образом для образования вторичного или костимулирующего сигнала (вторичные цитоплазматические передающие сигналы последовательности). В некоторых аспектах, CAR включает один или оба из таких передающих сигналы компонентов.

[0619] Рецептор, например, CAR, как правило, включает по меньшей мере один внутриклеточный передающий сигналы компонент или компоненты. В некоторых аспектах, CAR включает множество цитоплазматических передающих сигналы

последовательностей, которые регулируют первичную активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические передающие сигналы последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать мотивы передачи сигналов, известные как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические передающие сигналы последовательности включают последовательности, происходящие из цепи CD3-дзета, FcR-гамма, CD3-гамма, CD3-дельта и CD3-эпсилон. В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматические передающие сигналы молекула(молекулы) в CAR содержит(содержат) цитоплазматический передающий сигналы домен, его часть или последовательность, происходящую из CD3-дзета.

[0620] В некоторых вариантах осуществления, рецептор включает внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как цепь CD3 TCR, которая опосредует активацию и цитотоксичность Т-клетки, например, цепь CD3-дзета. Таким образом, в некоторых аспектах, антигенсвязывающая часть является связанной с одним или несколькими модулями передачи сигналов клеткам. В некоторых вариантах осуществления, модули передачи сигналов клеткам включают трансмембранный домен CD3, внутриклеточный передающий сигналы домены CD3 и/или другие трансмембранные домены CD3. В некоторых вариантах осуществления, рецептор, например, CAR, дополнительно включает часть одной или нескольких дополнительных молекул, таких как рецептор Fc γ , CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах, CAR или другой химерный рецептор включает химерную молекулу между CD3-дзета (CD3- ζ) или рецептором Fc γ и CD8, CD4, CD25 или CD16.

[0621] В некоторых вариантах осуществления, при связывании CAR или другого химерного рецептора, цитоплазматический домен или внутриклеточный передающий сигналы домен рецептора активирует по меньшей мере одно из нормальных эффекторных функций или ответов иммунocyта, 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, укороченный фрагмент внутриклеточного передающего сигналы домена компонента рецептора антигена или костимулирующей молекулы используют вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если он передает сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы 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 такими рецепторами для инициации передачи сигналов после привлечения рецептора антигена.

[0622] В контексте природного TCR, полная активация, как правило, требует не только передачи сигналов через TCR, но также костимулирующего сигнала. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, для стимуляции полной активации,

компонент для образования вторичного или костимулирующего сигнала также включают в CAR. В других вариантах осуществления, CAR не включает компонент для образования костимулирующего сигнала. В некоторых аспектах, дополнительный CAR является экспрессированным на той же клетке и обеспечивает компонент для образования вторичного или костимулирующего сигнала.

[0623] В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена содержит внутриклеточный домен Т-клеточной костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления, CAR включает передающий сигналы домен и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такого как CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 и ICOS. В некоторых аспектах, один и тот же CAR включает как активирующий, так и костимулирующий компоненты. В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена содержит внутриклеточный домен, происходящий из Т-клеточной костимулирующей молекулы, или его функциональный вариант, например, химерный между трансмембранным доменом и внутриклеточным передающим сигналы доменом. В некоторых аспектах, Т-клеточная костимулирующая молекула представляет собой CD28 или 41BB.

[0624] В некоторых вариантах осуществления, активирующий домен включен в один CAR, в то время как костимулирующий компонент предоставлен другим CAR, узнающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления, CAR включают активирующие или стимулирующие CAR, костимулирующие CAR, оба экспрессированные на одной и той же клетке (см. WO2014/055668). В некоторых аспектах, клетки включают один или несколько стимулирующих или активирующих CAR и/или костимулирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, клетки дополнительно включают ингибирующие CAR (iCAR, см. Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (December, 2013), такие как CAR, узнающие антиген, отличный от антигена, ассоциированного с и/или специфического для заболевания или состояния, посредством чего активирующий сигнал, подаваемый через нацеленный на заболевание CAR, уменьшают или ингибируют посредством связывания ингибирующего CAR с его лигандом, например, для уменьшения неспецифических эффектов.

[0625] В некоторых вариантах осуществления, два рецептора индуцируют, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал для клетки, так что связывание одного из рецепторов с его антигеном активирует клетку или индуцирует ответ, однако, связывание второго ингибирующего рецептора с его антигеном индуцирует сигнал, который супрессирует или ослабляет этот ответ. Примеры представляют собой активирующие CAR и ингибирующие CAR (iCAR). Такой способ можно использовать, например, для уменьшения вероятности неспецифических эффектов в контексте которых активирующий CAR связывает антиген, который экспрессируется при заболевании или состоянии, но который экспрессируется также на нормальных клетках, и ингибирующий рецептор связывает отдельный антиген, экспрессированный на нормальных клетках, но не на клетках, пораженных заболеванием или состоянием.

[0626] В некоторых аспектах, химерный рецептор представляет собой или включает ингибирующий CAR (например, iCAR) и включает внутриклеточные компоненты, которые ослабляют или супрессируют иммунный ответ, такие как стимулированный ИТАМ и/или костимулятором ответ клетки. Примеры таких внутриклеточных передающих сигналы компонентов представляют собой компоненты, обнаруженные в молекулах иммунных контрольных точек, включая PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, рецепторы PGE2, EP2/4, рецепторы аденозина, включая A2AR. В некоторых аспектах, модифицированная клетка включает ингибирующий CAR, включающий передающий сигналы домен ингибирующей молекулы или происходящий из такой ингибирующей молекулы, так что он служит для ослабления ответа клетки, например, индуцированного посредством активирующего и/или костимулирующего CAR.

[0627] В конкретных вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен содержит трансмембранный и передающий сигналы домен CD28, связанный с внутриклеточным доменом CD3 (например, CD3-дзета). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен содержит химерные из CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9) костимулирующие домены, связанные с внутриклеточным доменом CD3-дзета.

[0628] В некоторых вариантах осуществления, CAR включает один или несколько, например, два или более, костимулирующих доменов и активирующий домен, например, первичный активирующий домен, в цитоплазматической части. Иллюстративные CAR включают внутриклеточные компоненты CD3-дзета, CD28 и 4-1BB.

[0629] В некоторых вариантах осуществления, рецептор антигена дополнительно включает маркер, и/или клетки, экспрессирующие CAR или другой рецептор антигена, дополнительно включают суррогатный маркер, такой как поверхностный маркер клетки, который можно использовать для подтверждения трансдукции или модификации клетки для экспрессии рецептора. В некоторых аспектах, маркер включает весь или часть (например, укороченную форму) CD34, NGFR, или рецептора эпидермального фактора роста, такую как укороченный вариант такого рецептора поверхности клеток (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, является функционально связанной с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как расщепляемая линкерная последовательность, например, T2A. Например, маркер, и необязательно, линкерная последовательность, могут представлять собой любые, как описано в опубликованной патентной заявке No. WO2014031687. Например, маркер может представлять собой укороченный EGFR (tEGFR), необязательно, связанный с линкерной последовательностью, такой как расщепляемая линкерная последовательность T2A.

[0630] Иллюстративный полипептид для укороченного EGFR (например, tEGFR) содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 43 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: 43 или 44. Иллюстративная линкерная последовательность T2A содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 47 или 48, 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: 47 или 48.

[0631] В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой молекулу, например, поверхностный белок клетки, не обнаруженный в природе на Т-клетках или не обнаруженный в природе на поверхности Т-клеток, или его часть. В некоторых вариантах осуществления, молекула представляет собой не собственную молекулу, например, не собственный белок, т.е., белок, не узнаваемый как «собственный» иммунной системой хозяина, которому будут адоптивно переносить клетки.

[0632] В некоторых вариантах осуществления, маркер не выполняет терапевтической функции и/или не оказывает эффекта, отличного от использования в качестве маркера для генетической модификации, например, для отбора успешно модифицированных клеток. В других вариантах осуществления, маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу, иным образом оказывающую некоторый желательный эффект, такую как лиганд для клетки, которая может быть встречена *in vivo*, например, костимулирующую молекулу или молекулу иммунной контрольной точки, для усиления и/или ослабления ответов клеток после адоптивного переноса и встречи с лигандом.

[0633] В некоторых случаях, CAR обозначают как CAR первого, второго и/или третьего поколения. В некоторых аспектах, CAR первого поколения представляет собой CAR, обеспечивающий единственно индуцированный CD3-цепью сигнал после связывания антигена; в некоторых аспектах, CAR второго поколения представляет собой CAR, обеспечивающий такой сигнал и костимулирующий сигнал, такой как CAR, включающий внутриклеточный передающий сигналы домен из костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах, CAR третьего поколения представляет собой CAR, включающий множество костимулирующих доменов из различных костимулирующих рецепторов.

[0634] Например, в некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, такой как scFv, специфический для антигена, включая любой, как описано, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий передающую сигналы часть CD28 или ее функциональный вариант и передающую сигналы часть CD3-дзета или ее функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, такой как scFv, специфическое для антигена, включая любой, как описано, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и

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

[0635] В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен рекомбинантного рецептора, например, CAR, представляет собой или включает трансмембранный домен CD28 человека (например, No. доступа P01747.1) или его вариант, такой как трансмембранный домен, который содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 95, 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: 95; в некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен, содержащий часть рекомбинантного рецептора, содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 96, или последовательность аминокислот, имеющую по меньшей мере точно или приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ней.

[0636] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы компонент(ы) рекомбинантного рецептора, например, CAR, содержит внутриклеточный костимулирующий передающий сигналы домен CD28 человека или его функциональный вариант или часть, такой как домен с заменой LL на GG в положениях 186-187 природного белка CD28. Например, внутриклеточный передающий сигналы домен может содержать последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 97 или 98, 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: 97 или 98. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит внутриклеточный костимулирующий передающий сигналы домен 4-1BB (например, (No. доступа Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, такой как последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 99, 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: 99.

[0637] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен рекомбинантного рецептора, например, CAR, содержит стимулирующий передающий сигналы домен CD3-дзета человека или его функциональный вариант, такой как 112 ак цитоплазматический домен изоформы 3 CD3 ζ человека (No. доступа: P20963.2) или передающий сигналы домен CD3-дзета, как описано в Патенте США No.: 7446190 или Патенте США No. 8911993. Например, в некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный передающий сигналы домен содержит последовательность

аминокислот, как указано в SEQ ID NO: 100, 101 или 102, 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: 100, 101 или 102.

[0638] В некоторых аспектах, спейсер содержит только шарнирную область IgG, например, только шарнир из IgG4 или IgG1, такой как содержащий только шарнир спейсер, указанный в SEQ ID NO: 81. В других вариантах осуществления, спейсер представляет собой или содержит шарнир Ig, например, происходящий из IgG4 шарнир, необязательно, связанный с доменами CH2 и/или CH3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами CH2 и CH3, такой, как указано в SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный только с доменом CH3, такой, как указано в SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой или содержит богатую глицином-серином последовательность, или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры.

[0639] Например, в некоторых вариантах осуществления, CAR включает антитело, например, фрагмент антитела, включая scFv, спейсер, такой как спейсер, содержащий фрагмент молекулы иммуноглобулина, такой как шарнирная область и/или одна или несколько константных областей из молекулы тяжелой цепи, например, содержащий шарнир Ig спейсер, трансмембранный домен, содержащий весь или часть происходящего из CD28 трансмембранного домена, происходящий из CD28 внутриклеточный передающий сигналы домен и передающий сигналы домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления, CAR включает антитело или фрагмент, такой как scFv, спейсер, такой как любой из содержащих шарнир Ig спейсеров, происходящий из CD28 трансмембранный домен, происходящий из 4-1BB внутриклеточный передающий сигналы домен и происходящий из CD3-дзета передающий сигналы домен.

[0640] 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 43 или 44) или специфический для предстательной железы мембранный антиген (PSMA), или их модифицированную форму. 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 исключения 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, ген lacZ из E. coli, щелочная фосфатаза, секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Иллюстративные гены светоиспускающих репортеров включают гены люциферазы (luc), β -галактозидазы, хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT), β -глюкуронидазы (GUS) или их варианты.

[0641] В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой маркер устойчивости или селективный маркер. В некоторых вариантах осуществления, маркер устойчивости или селективный маркер представляет собой или содержит полипептид, придающий устойчивость к экзогенным средствам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления, маркер устойчивости или селективный маркер представляет собой ген устойчивости к антибиотику. В некоторых вариантах осуществления, маркер устойчивости или селективный маркер представляет собой ген устойчивости к антибиотику, придающий устойчивость к антибиотику клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, маркер устойчивости или селективный маркер представляет собой или содержит ген устойчивости к пуромицину, ген устойчивости к гигромицину, ген устойчивости к бластицидину, ген устойчивости к неомицину, ген устойчивости к генетицину или ген устойчивости к зеоцину, или их модифицированную форму.

[0642] В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, является функционально связанной с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как отщепляемая линкерная последовательность, например, T2A. Например, маркерная, и необязательно, линкерная последовательность, может быть любой, как описано в Публикации PCT No. WO2014031687.

[0643] В некоторых вариантах осуществления, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие такие конструкции CAR, дополнительно включают последовательность, кодирующую элемент проскальзывания рибосомы T2A и/или последовательность tEGFR, например, ниже последовательности, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления, последовательность кодирует элемент проскальзывания рибосомы T2A, указанный в SEQ ID NO: 47 или 48, 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: 47 или 48.

[0644] В некоторых вариантах осуществления, T-клетку, экспрессирующую рецептор антигена (например, CAR), можно также получать с экспрессией укороченного EGFR (EGFRt) в качестве неиммуногенного селективного эпитопа (например, посредством введения конструкции, кодирующей CAR и EGFRt, разделенные переключателем рибосомы T2A, для экспрессии двух белков с одной и той же конструкции), который можно затем использовать в качестве маркера для детекции таких клеток (см., например, Патент США No. 8802374). В некоторых вариантах осуществления, последовательность кодирует последовательность tEGFR, указанную в SEQ ID NO: 43 или 44, 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: 43 или 44. 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 deFelipe et al. *Traffic* 5:616-626 (2004)). Известно множество элементов 2A. Примеры последовательностей 2A, которые можно использовать в способах и нуклеиновых кислотах, описанных в настоящем описании, включают, без ограничения, последовательности 2A из вируса ящура (F2A, например, SEQ ID NO: 45), вируса ринита лошадей А (E2A, например, SEQ ID NO: 46), вируса *Thosea asigna* (T2A, например, SEQ ID NO: 47 или 48) и тешовируса-1 свиней (P2A, например, SEQ ID NO: 49 или 50), как описано в Публикации Патента США No. 20070116690.

[0645] Рекомбинантные рецепторы, такие как CAR, экспрессированные клетками, введенными субъекту, как правило, узнают или специфически связывают молекулу, экспрессированную при, ассоциированную с и/или специфическую для заболевания или состояния, или пораженных им клеток, подвергаемых лечению. После специфического связывания с молекулой, например, антигеном, рецептор, как правило, доставляет иммуностимулирующий сигнал, такой как передаваемый ITAM сигнал, в клетку, таким образом, стимулируя иммунный ответ, нацеленный на заболевание или состояние. Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки экспрессируют CAR, который специфически связывает антиген, экспрессированный клеткой или тканью, пораженными заболеванием или состоянием, или ассоциированными с заболеванием или состоянием.

2. Химерный рецептор аутоантитела (СААР)

[0646] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор аутоантитела (СААР). В некоторых вариантах осуществления, СААР связывает, например, специфически связывает, или узнает, аутоантитело. В некоторых вариантах осуществления, клетку, экспрессирующую СААР, такую как Т-клетка, модифицированная для экспрессии СААР, можно использовать для связывания и уничтожения экспрессирующих аутоантитело клеток, но не экспрессирующих нормальное антитело клеток. В некоторых вариантах осуществления, экспрессирующие СААР клетки можно использовать для лечения аутоиммунного заболевания, ассоциированного с экспрессией собственных антигенов, такого как аутоиммунные заболевания. В некоторых вариантах осуществления, экспрессирующие СААР 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 СААР 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 аутоантитела. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой СААР, такой как любой из описанных в Публикации патентной заявки США No. US 2017/0051035.

[0647] В некоторых вариантах осуществления, СААР содержит связывающий аутоантитело домен, трансмембранный домен, и один или несколько внутриклеточных передающих сигналы областей или доменов (также взаимозаменяемо называемых цитоплазматическими передающими сигналы 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 первичный 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 ζ), или их функциональный вариант или передающую сигналы часть), и/или передающий сигналы домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

[0648] 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.

3. Т-клеточные рецепторы (TCR)

[0649] 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.

[0650] В некоторых вариантах осуществления, «Т-клеточный рецептор» или «TCR» представляет собой молекулу, которая содержит переменные цепи α и β (также известные как TCR α и TCR β , соответственно) или переменные цепи γ и δ (также известные как TCR α и TCR β , соответственно), или их антигенсвязывающие фрагменты, и которая является способной специфически связывать пептид, связанный с молекулой МНС. В некоторых вариантах осуществления, TCR находится в форме $\alpha\beta$. Как правило, TCR, существующие в формах $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$, 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).

[0651] 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 α -цепь и переменная β -цепь TCR, достаточные для формирования участка связывания для связывания со специфическим комплексом МНС-пептид. Как правило, переменные цепи TCR содержат определяющие комплементарность области, вовлеченные в узнавание пептида, МНС и/или комплекса МНС-пептид.

[0652] В некоторых вариантах осуществления, переменные домены TCR содержат гиперпеременные петли или определяющие комплементарность области (CDR), которые, как правило, вносят первичный вклад в способность и специфичность узнавания и связывания антигена. В некоторых вариантах осуществления, CDR из TCR

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

[0653] В некоторых вариантах осуществления, TCR может также содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический хвост (см., например, Janeway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). В некоторых аспектах, каждая цепь TCR может иметь один N-концевой варибельный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост на C-конце. В некоторых вариантах осуществления, TCR ассоциирован с инвариантными белками из комплекса CD3, вовлеченными в опосредование передачи сигнала.

[0654] В некоторых вариантах осуществления, цепь TCR содержит один или несколько константных доменов. Например, внеклеточная часть данной цепи TCR (например, α -цепь или β -цепь) может содержать два иммуноглобулиноподобных домена, таких как варибельный домен (например, $V\alpha$ 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 α -цепи/или $C\alpha$, как правило, положения 117-259 цепи на основании нумерации Kabat или константный домен β 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 варибельных домена, где каждый из

вариабельных доменов содержит CDR. Константный домен TCR может содержать короткие связывающие последовательности в которых остаток цистеина формирует дисульфидную связь, таким образом, связывая две цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR может иметь дополнительный остаток цистеина на каждой из α и β цепей, так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

[0655] 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 заякоривать белок в мембране клетки и вступать в ассоциацию с инвариантными субъединицами аппарата или комплекса передачи сигналов CD3. Внутриклеточные хвосты передающих сигналы субъединиц CD3 (например, цепей CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 ζ) содержат один или несколько иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов или ITAM, которые вовлечены в способность комплекса TCR передавать сигналы.

[0656] В некоторых вариантах осуществления, TCR может представлять собой гетеродимер из двух цепей α и β (или необязательно γ и δ), или он может представлять собой конструкцию одноцепочечного TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (цепи α и β или цепи γ и δ), которые являются связанными, например, посредством дисульфидной связи/или дисульфидных связей.

[0657] В некоторых вариантах осуществления, TCR можно получать из известной последовательности(последовательностей) TCR, таких как последовательности цепей V α , β , для которых по существу полноразмерная кодирующая последовательность является легко доступной. Способы получения полноразмерных последовательностей TCR, включая последовательности 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.

[0658] 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.

[0659] 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 инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). В некоторых вариантах осуществления, библиотеки TCR можно получать из CD4+ или CD8+ T-клеток. В некоторых вариантах осуществления, TCR можно амплифицировать из T-клеточного источника от нормального здорового субъекта, т.е. библиотек нормальных TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR можно амплифицировать из T-клеточного источника от пораженного заболеванием субъекта, т.е. библиотек 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, полученных от людей. В некоторых вариантах осуществления, библиотеки 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. В некоторых аспектах, TCR подвергают направленной эволюции, например, посредством мутагенеза, например, цепи α или β . В некоторых аспектах, конкретные остатки в пределах CDR TCR изменяют. В некоторых вариантах осуществления, отобранные TCR можно модифицировать посредством аффинного созревания. В некоторых вариантах осуществления, можно отбирать антигенспецифические 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 avidности для антигена.

[0660] 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 MHC-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 несколько остатков CDR мутированы, и отбирают мутанты с желательным измененным свойством, таким как более высокая аффинность для желательного антигена-мишени.

[0661] 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 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.

[0662] Мотивы, связывающие HLA-A0201, и участки расщепления для протеасом и иммунопротеасом, с использованием компьютерных прогностических моделей, известны. Для прогнозирования участков связывания MHC класса I, такие модели включают, но без ограничения, ProPred1 (описанную более подробно в Singh and Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237 2001), и SYFPEITHI (см. Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 409(1): 75-93 2007).

[0663] В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающая часть может представлять собой полученный рекомбинантным способом природный белок или его мутантную форму, в которой изменены одно или несколько свойств, таких как характеристики связывания. В некоторых вариантах осуществления, TCR может происходить из одного из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса или другое млекопитающее. TCR может находиться в связанной с клеткой или в растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления, для целей представленных способов, TCR находится в связанной с клеткой форме, экспрессированной на поверхности клетки.

[0664] В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой полноразмерный TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой димерный TCR (dTTCR). В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой одноцепочечный TCR (sc-TTCR). В некоторых вариантах осуществления, dTTCR или scTTCR имеют структуры, как описано WO 03/020763, WO 04/033685, WO2011/044186.

[0665] В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит последовательность, соответствующую трансмембранной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит последовательность, соответствующую цитоплазматической последовательности. В некоторых вариантах осуществления, TCR является способным формировать комплекс TCR с CD3. В некоторых вариантах осуществления, любые из TCR, включая dTTCR или scTTCR, могут быть связаны с передающими сигналами доменами, что приводит к образованию активного TCR на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, TCR является экспрессированным на поверхности клеток.

[0666] В некоторых вариантах осуществления, dTTCR содержит первый полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области α -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области α -цепи TCR, и второй полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области β -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области β -цепи TCR, где первый и второй полипептиды связаны посредством дисульфидной связи. В некоторых вариантах осуществления, связь может соответствовать природной межцепевой дисульфидной связи, присутствующей в природных димерных TCR $\alpha\beta$. В некоторых вариантах осуществления, межцепевые дисульфидные связи не присутствуют в природном TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько остатков цистеина можно включать в внеклеточные последовательности константной области пары полипептидов dTTCR. 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.

[0667] В некоторых вариантах осуществления, dTTCR содержит α -цепь TCR, содержащую вариабельный домен α , константный домен α и первый мотив для димеризации, присоединенный к С-концу константного домена α , и β -цепь TCR, содержащую вариабельный домен β , константный домен β и первый мотив для димеризации, присоединенный к С-концу константного домена β , где первый и второй мотивы для димеризации легко взаимодействуют с образованием ковалентной связи между аминокислотой в первом мотиве для димеризации и аминокислотой во втором мотиве для димеризации, связывая вместе α -цепь TCR и β -цепь TCR.

[0668] В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой scTCR. Как правило, scTCR можно получать с использованием известных способов, См., например, Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. and Plücker, 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, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; и Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит введенную неприродную дисульфидную межцепевую связь для облегчения ассоциации цепей TCR (см., например, Международную публикацию PCT No. WO 03/020763). В некоторых вариантах осуществления, scTCR представляет собой не связанный дисульфидной связью укороченный TCR, в котором гетерологичные лейциновые молнии, слитые с его С-концами, облегчают ассоциацию цепей (см., например, Международную публикацию PCT No. WO99/60120). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит переменный домен TCR α , ковалентно связанный с переменным доменом TCR β посредством пептидного линкера (см., например, Международную публикацию PCT No. WO99/18129).

[0669] В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый фрагмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей переменной области α -цепи TCR, второй фрагмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей переменной области β -цепи TCR, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константного домена β -цепи TCR, и линкерную последовательность, связывающую С-конец первого фрагмента с N-концом второго фрагмента.

[0670] В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый фрагмент, состоящий из последовательности переменной области α -цепи, слитой с N-концом внеклеточной последовательности константного домена α -цепи, и второй фрагмент, состоящий из последовательности переменной области β -цепи, слитой с N-концом внеклеточной константной последовательности и трансмембранной последовательности β -цепи, и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую С-конец первого фрагмента с N-концом второго фрагмента.

[0671] В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый фрагмент, состоящий из последовательности переменной области β -цепи TCR, слитой с N-концом внеклеточной последовательности константного домена β -цепи, и второй фрагмент, состоящий из последовательности переменной области α -цепи, слитой с N-концом внеклеточной константной последовательности и трансмембранной последовательности α -цепи, и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую С-конец первого фрагмента с N-концом второго фрагмента.

[0672] 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 С-концом первого фрагмента и N-концом второго фрагмента, или наоборот, но является не слишком длинным для блокирования или уменьшения связывания scTCR с его лигандом-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, линкер может содержать от 10 до 45 аминокислот или от приблизительно 10 до приблизительно 45 аминокислоты, 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-(SGGG)5-P-, где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин, и S представляет собой серин (SEQ ID NO:38). В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет последовательность GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO:39).

[0673] В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, связывающую остаток из иммуноглобулиновой области константного домена α -цепи с остатком из иммуноглобулиновой области константного домена β -цепи. В некоторых вариантах осуществления, межцепевая дисульфидная связь в природном TCR не присутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько остатков цистеина можно включать в внеклеточные последовательности константной области первого и второго фрагментов полипептида scTCR. В некоторых случаях, как природная, так и неприродная дисульфидная связь может являться желательной.

[0674] В некоторых вариантах осуществления dTCR или scTCR содержащих введенные межцепевые дисульфидные связи, природные дисульфидные связи не присутствуют. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько 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 PCT No. WO2006/000830.

[0675] В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающий фрагмент имеет аффинность с равновесной константой связывания для антигена-мишени между точно или приблизительно 10^{-5} и 10^{-12} M, и всеми ее индивидуальными значениями и диапазонами. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой комплекс MHC-пептид или лиганд.

[0676] В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, например, цепи α и β , можно амплифицировать посредством ПЦР, клонирования или других пригодных способов и клонировать в пригодные экспрессирующий вектор или векторы. Экспрессирующий вектор может представлять собой любой пригодный рекомбинантный экспрессирующий вектор, и может быть использован для трансформации или трансфекции любого пригодного хозяина. Пригодные векторы включают векторы, разработанные для воспроизведения и размножения или для экспрессии, или для того и другого, такие как плазмиды и вирусы.

[0677] В некоторых вариантах осуществления, вектор может представлять собой вектор из серий pUC (Fermentas Life Sciences), серий pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), серий pET (Novagen, Madison, Wis.), серий pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) или серий pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). В некоторых случаях, бактериофаговые векторы, такие как λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 и λ NM1149, также могут быть использованы. В некоторых вариантах осуществления, экспрессирующие векторы для растений могут быть использованы и включают pBI01, pBI01.2, pBI01.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В некоторых вариантах осуществления, экспрессирующие векторы для животных включают pEUK-C1, pMAM и pMAMneo (Clontech). В некоторых вариантах осуществления, используют вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор.

[0678] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные экспрессирующие векторы можно получать с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК. В некоторых вариантах осуществления, векторы могут содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые являются специфическими для типа хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), для введения которому предназначен вектор, по необходимости и принимая во внимание, основан ли вектор на ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления, вектор может содержать неприродный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей TCR или антигенсвязывающую часть (или другую связывающую МНС-пептид молекулу). В некоторых вариантах осуществления, промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, такой как промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор, обнаруженный в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мыши. Другие известные промоторы также предусмотрены.

[0679] В некоторых вариантах осуществления, для получения вектора, кодирующего TCR, цепи α и β амплифицируют посредством ПЦР с тотальной кДНК, выделенной из клона Т-клеток, экспрессирующего представляющий интерес TCR, и клонируют в экспрессирующий вектор. В некоторых вариантах осуществления, цепи α и β клонируют в один и тот же вектор. В некоторых вариантах осуществления, цепи α и β клонируют в различные векторы. В некоторых вариантах осуществления, полученные цепи α и β вставляют в ретровирусный, например, лентивирусный, вектор.

В. Нуклеиновые кислоты, векторы и способы для генетической инженерии

[0680] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, Т-клетки, генетически модифицируют для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, модификацию проводят посредством введения одного или нескольких полинуклеотидов(полинуклеотидов), кодирующих рекомбинантный рецептор или его части или компоненты. Настоящее изобретение относится также к полинуклеотидам, кодирующим рекомбинантный рецептор, и к векторам или конструкциям, содержащим такие нуклеиновые кислоты и/или полинуклеотиды.

[0681] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, содержит по меньшей мере один промотор, функционально связанный для контроля экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых примерах, полинуклеотид содержит два, три или более промоторов, функционально связанных для контроля экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид может содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые являются специфическими для типа хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), для введения которому предназначен полинуклеотид, по необходимости и принимая во внимание, основан ли полинуклеотид на ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид может содержать регуляторные/контрольные элементы, такие как промотор, энхансер, интрон, сигнал полиаденилирования, консенсусную последовательность Козак, внутренние участки связывания рибосомы (IRES), последовательность 2A и акцептор или донор сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид может содержать неприродный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей рекомбинантный рецептор и/или один или несколько дополнительных полипептид(ов). В некоторых вариантах осуществления, промотор выбран среди промотора RNA pol I, pol II или pol III. В некоторых вариантах осуществления, промотор узнаваем РНК-полимеразой II (например, CMV, ранняя область SV40 или главный поздний промотор аденовируса). В другом варианте осуществления, промотор узнаваем РНК-полимеразой III (например, промотор U6 или H1). В некоторых вариантах осуществления, промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, такой как промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор, обнаруженный в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мыши. Другие известные промоторы также предусмотрены.

[0682] В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой или содержит конститутивный промотор. Иллюстративные конститутивные промоторы включают, например, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), немедленный ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор убиквитина С человека (UBC), промотор фактора элонгации 1 α человека (EF1 α), промотор фосфоглицераткиназы 1 мышцы (PGK) и промотор β -актина курицы в сочетании с ранним энхансером CMV (CAGG). В некоторых

вариантах осуществления, конститутивный промотор представляет собой синтетический или модифицированный промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой или содержит промотор MND, синтетический промотор, содержащий область U3 из модифицированного LTR MoMuLV с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы (см. Challita et al. (1995) J. Virol. 69(2):748-755). В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В другом варианте осуществления, промотор представляет собой вирусный промотор. В другом варианте осуществления, промотор представляет собой невирусный промотор. В некоторых вариантах осуществления, иллюстративные промоторы могут включать, но без ограничения, промотор фактора элонгации 1 альфа человека (EF1 α) или его модифицированную форму, или промотор MND.

[0683] В другом варианте осуществления, промотор представляет собой регулируемый промотор (например, индуцируемый промотор). В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой индуцируемый промотор или репрессируемый промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор содержит последовательность оператора Lac, последовательность тетрациклинового оператора, последовательность галактозного оператора или последовательность доксицилинового оператора, или представляет собой их аналог, или является способным к связыванию или узнаванию репрессором Lac или тетрациклиновым репрессором, или их аналогом. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид не включает регуляторный элемент, например, промотор.

[0684] В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. В некоторых аспектах, сигнальная последовательность может кодировать сигнальный пептид, происходящий из нативного полипептида. В других аспектах, сигнальная последовательность может кодировать гетерологичный или неприродный сигнальный пептид, такой как иллюстративный сигнальный пептид из альфа-цепи GMCSFR, указанный в SEQ ID NO:40 и кодируемый нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:41. В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, например, химерный рецептор антигена (CAR), содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Неограничивающие иллюстративные сигнальные пептиды включают, например, сигнальный пептид альфа-цепи GMCSFR, указанный в SEQ ID NO: 40 и кодируемый нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:40, или сигнальный пептид CD8-альфа, указанный в SEQ ID NO:42.

[0685] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько дополнительных полипептидов, например, один или несколько маркер(ов) и/или одну или несколько эффекторных молекул. В некоторых вариантах осуществления, один или

несколько маркер(ов) включает маркер трансдукции, суррогатный маркер и/или маркер устойчивости или селективный маркер. Среди введенных дополнительных последовательностей нуклеиновой кислоты, например, кодирующих один или несколько дополнительных полипептид(ов), включены последовательности нуклеиновой кислоты, которые могут улучшать эффективность терапии, например, посредством стимуляции жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; последовательности нуклеиновой кислоты для предоставления генетического маркера для отбора и/или оценки клеток, например, для оценки выживаемости/или локализации *in vivo*; последовательности нуклеиновой кислоты для улучшения безопасности, например, посредством придания клетки чувствительности к отрицательному отбору *in vivo*, как описано в Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); и Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); см. также WO 1992008796 и WO 1994028143, описывающие использование бифункциональных поддающихся отбору слитых генов, полученных в результате слияния доминантного положительного селективного маркера с отрицательным селективным маркером, и Патент США No. 6040177.

[0686] 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. Внешние маркерные гены можно, в некоторых случаях, использовать в сочетании с модифицированной клеткой, чтобы позволять детекцию или отбор клеток и, в некоторых случаях, также стимулировать уничтожение клетки и/или самоубийство клетки.

[0687] 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: 43 или 44), или специфический для предстательной железы мембранный антиген (PSMA) или его модифицированная форма, такая как укороченный PSMA (tPSMA). В некоторых аспектах, tEGFR может содержать эпитоп, узнаваемый антителом цетуксимабом (эрбитуксом ®) или другим терапевтическим антителом против EGFR, или связывающей молекулой, который можно использовать для идентификации или отбора клеток, модифицированных с использованием конструкции tEGFR и кодируемого экзогенного белка, и/или для исключения или отделения клеток, экспрессирующих кодируемый экзогенный белок. См. Патент США No. 8802374 и Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434). В некоторых аспектах, маркер, например, суррогатный маркер, включает весь или часть (например, укороченную форму) CD34, NGFR, CD19 или укороченный CD19, например, укороченный не относящийся к человеку CD19. Иллюстративный полипептид для укороченного EGFR (например, tEGFR) содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 43 или 44, 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: 43 или 44.

[0688] В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит поддающийся детекции белок, такой как флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперсвернутый GFP (sfGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-зеленый флуоресцентный белок (BFP), улучшенный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP), и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты, подвергнутые оптимизации кодонного состава, стабилизированные и/или улучшенные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит фермент, такой как люцифераза, ген lacZ из E. coli, щелочная фосфатаза, секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Иллюстративные гены светоиспускающих репортеров включают гены люциферазы (luc), β -галактозидазы, хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT), β -глюкуронидазы (GUS) или их варианты. В некоторых аспектах, экспрессию фермента можно детектировать посредством добавления субстрата, который можно детектировать при экспрессии и функциональной активности фермента.

[0689] В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой маркер устойчивости или селективный маркер. В некоторых вариантах осуществления, маркер устойчивости или селективный маркер представляет собой или содержит полипептид,

придающий устойчивость к экзогенным средствам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления, маркер устойчивости или селективный маркер представляет собой ген устойчивости к антибиотику. В некоторых вариантах осуществления, маркер устойчивости или селективный маркер представляет собой ген устойчивости к антибиотику, придающий устойчивость к антибиотику клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, маркер устойчивости или селективный маркер представляет собой или содержит ген устойчивости к пуромицину, ген устойчивости к гигромицину, ген устойчивости к бластицидину, ген устойчивости к неомицину, ген устойчивости к генетицину или ген устойчивости к зеоцину или их модифицированную форму.

[0690] Любые рекомбинантные рецепторы и/или дополнительные полипептид(ы), описанные в настоящем описании, могут быть кодированы одним или несколькими полинуклеотидами, содержащими одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих рекомбинантные рецепторы, в любых комбинациях, ориентации или аранжировках. Например, один, два, три/или более полинуклеотидов могут кодировать один, два, три/или более различных полипептидов, например, рекомбинантных рецепторов, или их частей или компонентов, и/или один или несколько дополнительных полипептид(ов), например, маркер и/или эффекторную молекулу. В некоторых вариантах осуществления, один полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, например, CAR, или его часть или компоненты, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько дополнительных полипептид(ов). В некоторых вариантах осуществления, один вектор или конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, например, CAR, или его часть или компоненты, и отдельный вектор или конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько дополнительных полипептид(ов). В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая один или несколько дополнительных полипептид(ов), являются функционально связанными с двумя различными промоторами. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, присутствует выше нуклеиновой кислоты, кодирующей один или несколько дополнительных полипептид(ов). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, присутствует ниже нуклеиновой кислоты, кодирующей один или несколько дополнительных полипептид(ов).

[0691] В конкретных случаях, один полинуклеотид содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие две или более различных полипептидных цепей, например, рекомбинантный рецептор и один или несколько дополнительных полипептид(ов), например, маркер и/или эффекторную молекулу. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие две или более

различных полипептидных цепей, например, рекомбинантный рецептор и один или несколько дополнительных полипептид(ов), присутствуют в двух отдельных полинуклеотидах. Например, представлены два отдельных полинуклеотида, и каждый можно индивидуально переносить или вводить в клетку для экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие маркер, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие рекомбинантный рецептор, присутствуют или вставлены в различных локализациях в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие маркер, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие рекомбинантный рецептор, являются функционально связанными с двумя различными промоторами.

[0692] 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, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие рекомбинантный рецептор, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие один или несколько дополнительных полипептид(ов), являются функционально связанными с одним и тем же промотором и являются, необязательно, отделенными внутренним участком связывания рибосомы (IRES), или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскальзывание рибосомы, такой как элемент 2A. Например, иллюстративный маркер, и необязательно, последовательность проскальзывания рибосомы, могут являться любыми, как описано в Публикации PCT No. WO2014031687.

[0693] В некоторых вариантах осуществления, транскрипционные единицы могут являться модифицированными в форме бицистронной единицы, содержащей IRES, что позволяет совместную экспрессию продуктов генов (например, кодирующих рекомбинантный рецептор и дополнительный полипептид) посредством матричной РНК с одного промотора. Альтернативно, в некоторых случаях, один промотор может управлять экспрессией РНК, содержащей, в одной открытой рамке считывания (ORF), два или три гена (например, кодирующий маркер и кодирующий рекомбинантный 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: 45), вируса ринита лошадей А (E2A, например, SEQ ID NO: 46), вируса *Thosea asigna* (T2A, например, SEQ ID NO: 47 или 48) и тешовируса-1 свиней (P2A, например, SEQ ID NO: 49 или 50), как описано в Публикации Патента США No. 20070116690.

[0694] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, и/или дополнительный полипептид, содержится в векторе или может быть клонирован в один или несколько вектор(ов). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько вектор(ов) можно использовать для трансформации или трансфекции клетки-хозяина, например, клетки для модификации. Иллюстративные векторы включают векторы, разработанные для введения, воспроизведения и размножения или для экспрессии, или для того и другого, такие как плазмидные и вирусные векторы. В некоторых аспектах, вектор представляет собой экспрессирующий вектор, например, рекомбинантный экспрессирующий вектор. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные экспрессирующие векторы можно получать с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК.

[0695] В некоторых вариантах осуществления, вектор может представлять собой вектор из серий pUC (Fermentas Life Sciences), серий pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), серий pET (Novagen, Madison, Wis.), серий pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) или серий pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). В некоторых случаях, бактериофаговые векторы, такие как λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4, и λ NM1149, также могут быть использованы. В некоторых вариантах осуществления, экспрессирующие векторы для растений могут быть использованы и включают pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В некоторых вариантах осуществления, экспрессирующие векторы для животных включают pEUK-CI, pMAM и pMAMneo (Clontech).

[0696] В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор и/или дополнительный полипептид(ы), вводят в клетку посредством ретровирусных или лентивирусных векторов, или посредством транспозонов (см., например, Baum et al. (2006) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 13:1050-1063; Frecha et al. (2010) *Molecular Therapy* 18:1748-1757; и Hackett et al. (2010) *Molecular Therapy* 18:674-683).

[0697] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько полинуклеотид(ов) вводят в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, например, таких как векторы, происходящие из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько полинуклеотид(ов) вводят в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гаммаретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 November 29(11): 550-557.

[0698] В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой ретровирусный вектор. В некоторых аспектах, ретровирусный вектор имеет последовательность длинного концевой повтора (LTR), например, из ретровирусного вектора, происходящую из вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мыши (MESV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV), вируса, образующего очаги в селезенке (SFFV), или аденоассоциированного вируса (AAV). Большинство ретровирусных векторов происходят из мышинных 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.

[0699] 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. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор и/или один или несколько дополнительных полипептид(ов), вводят в композицию, содержащую культивированные клетки, например, посредством ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

[0700] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько полинуклеотид(ов) вводят в Т-клетку с использованием электропорации (см., например, Chicaybam et al, (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437). В некоторых вариантах осуществления, 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, например, полинуклеотидов и/или векторов, в иммунocyтaх 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) и другие способы, описанные, например, в Международной патентной публикации No. WO 2014055668 и Патенте США No. 7446190.

[0701] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько полинуклеотид(ов) или вектор(ов), кодирующих рекомбинантный рецептор и/или дополнительный полипептид(ы), можно вводить в клетки, например, Т-клетки, либо во время, либо после размножения. Это введение полинуклеотида(полинуклеотидов) или вектора(векторов) можно проводить, например, с использованием любого пригодного ретровирусного вектора. Полученные генетически модифицированные клетки можно затем освобождать от исходного стимула (например, стимула против CD3/против CD28) и затем стимулировать с использованием второго типа стимула например, с использованием нового введенного рецептора). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме пептида/молекулы МНС, родственной (перекрестно сшивающий) лиганд для генетически введенного рецептора (например, природный антиген и/или лиганд CAR) или любой лиганд (такой как антитело), который напрямую связывается в пределах каркаса нового рецептора (например, узнающий константные области 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)*.

[0702] 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.

V. КОМПОЗИЦИИ, СОСТАВЫ И СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ

[0703] Настоящее изобретение относится также к композициям, содержащим стимулированные и отобранные клетки, необязательно, генетически модифицированные (например, модифицированные рецептором антигена), таким как CAR или TCR, и к композициям, содержащим клетки, включая фармацевтические композиции и составы. Настоящее изобретение относится также к способам использования и к применениям композиций, например, в лечении заболеваний, состояний и нарушений, при которых экспрессируется антиген, или в способах детекции, диагностических и прогностических способах.

А. Композиции/Составы

[0704] 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.

[0705] «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.

[0706] В некоторых аспектах, выбор носителя частично определяется конкретной клеткой 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 приблизительно от 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 EDTA; 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).

[0707] 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).

[0708] Состав или композиция могут также содержать более одного активного ингредиента, которые можно использовать для конкретного признака, заболевания или состояния, подвергаемых лечению с использованием клеток, предпочтительно, ингредиенты с активностью, дополняющей активность клеток, 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, клетки или антитела 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, фумаровая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная и арилсульфоновая кислоты, например, *p*-толуолсульфоновая кислота.

[0709] Активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, в коллоидные системы доставки лекарственного средства (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. В конкретных вариантах осуществления, фармацевтическую композицию составляют в форме комплекса включения, например, циклодекстринового комплекса включения, или в форме липосомы. Липосомы могут служить для нацеливания клеток-хозяев (например, Т-клеток или клеток НК) на конкретную ткань. Множество способов являются доступными для получения липосом, таких как способы, описанные, например, в Szoka et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9: 467 (1980), и Патентах США 4235871, 4501728, 4837028, и 5019369.

[0710] В фармацевтической композиции, в некоторых аспектах, можно использовать системы доставки с постоянным высвобождением, отсроченным высвобождением и с замедленным высвобождением, так что доставка композиции происходит до, и в течение достаточного времени для вызова сенсбилизации участка, подлежащего лечению. Множество типов системы доставки с высвобождением являются доступными и известными. Такие системы могут исключать повторные введения композиции, таким образом, увеличивая удобство для субъекта и терапевта.

[0711] Фармацевтическая композиция, в некоторых вариантах осуществления, содержит 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 достижения желательной супрессии 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.

[0712] Клетки можно вводить с использованием стандартных способов, составов и/или устройств для введения. Настоящее изобретение относится к составам и устройствам, таким как шприцы и флаконы, для хранения и введения композиций. Введение клеток 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), ее, как правило, составляют в единичной дозированной пригодной для инъекции форме (растворе, суспензии, эмульсии).

[0713] Составы включают составы для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, внутрилегочного, чрескожного, внутримышечного, интраназального, трансбуккального, подъязычного введения, или введения с использованием суппозитория. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток вводят парентерально. Термин «парентеральное», в рамках изобретения, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток вводят субъекту с использованием периферической системной доставки посредством внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

[0714] 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.

[0715] Стерильные пригодные для инъекции растворы можно получать посредством включения клеток в растворитель, например, в смеси с пригодным носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, физиологический солевой раствор, глюкоза, декстроза или т.п. Композиции могут также являться лиофилизированными. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие, диспергирующие вещества или эмульгаторы (например, метилцеллюлозу), забуферивающие рН средства, гелеобразующие или повышающие вязкость добавки, консерванты, ароматизаторы и/или окрашивающие средства, в зависимости от желательного способа введения и получения. В некоторых аспектах, можно консультироваться со стандартными руководствами для получения пригодных препаратов.

[0716] Различные добавки, которые повышают стабильность и стерильность композиции, включая противомикробные консерванты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и буферы, можно добавлять. Предотвращение действия микроорганизмов можно обеспечивать посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола и сорбиновой кислоты. Длительную абсорбцию пригодной для инъекции фармацевтической формы можно получать с использованием средств, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0717] Можно получать препараты с замедленным высвобождением. Пригодные примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матриксы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, где матриксы находятся в форме формованных изделий, например, пленок или микрокапсул.

[0718] Составы, подлежащие использованию для введения *in vivo*, как правило, являются стерильными. Стерильность можно легко обеспечивать, например, посредством фильтрации через мембраны для стерилизации фильтрацией.

В. Способы введения

[0719] Настоящее изобретение относится к способам введения клеток, популяций и композиций, и к применениям таких клеток, популяций и композиций для лечения или предотвращения заболеваний, состояний и нарушений, включая злокачественные опухоли. Настоящее изобретение относится также к способам использования и к применениям клеток, популяций и композиций, и к применениям таких клеток, популяций и композиций для лечения или предотвращения заболеваний, состояний и нарушений, включая злокачественные опухоли. В конкретных вариантах осуществления, клетки, популяции и композиции являются такими, какие получены и модифицированы, в

соответствии с любыми представленными способами. В некоторых вариантах осуществления, клетки, популяции, и композиции вводят субъекту или пациенту, имеющему конкретное заболевание или состояние, подлежащее лечению, например, посредством адоптивной клеточной терапии, такой как адоптивная Т-клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления, клетки и композиции, полученные посредством представленных способов, такие как модифицированные композиции и композиции на конечном этапе производственного цикла после инкубации и/или других стадий переработки, вводят субъекту, такому как субъект, имеющий заболевание или состояние, или подверженный риску заболевания или состояния. В некоторых аспектах, способы таким образом, обеспечивают лечение, например, облегчение одного или нескольких симптомов заболевания или состояния, например, посредством уменьшения опухолевой нагрузки при злокачественной опухоли, экспрессирующий антиген, узнаваемый модифицированной Т-клеткой.

[0720] Такие способы и применения включают терапевтические способы и применения, например, включающие введение клеток и композиций, полученных посредством представленных способов, таких как модифицированные композиции и композиции на конечном этапе производственного цикла после инкубации и/или других стадий переработки, субъекту, имеющему заболевание, состояние или нарушение, такое как злокачественная опухоль, для осуществления лечения заболевания или нарушения. Применения включают применения композиций в таких способах и видах лечения, и применения таких композиций в получении лекарственного средства для осуществления таких терапевтических способов. В некоторых вариантах осуществления, с использованием способов и применений, таким образом, лечат заболевание или состояние, или нарушение, такое как опухоль или злокачественная опухоль, у субъекта.

[0721] Способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут быть использованы в связи с представленными способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в Публикации патентной заявки США No. 2003/0170238 от Gruenberg et al; Патенте США No. 4690915 от Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8(10):577-85). См., например, Themeli et al. (2013) *Nat Biotechnol.* 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338.

[0722] В рамках изобретения, «субъект» представляет собой млекопитающее, такое как человек или другое животное, и как правило, представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления, субъект, например, пациент, которому вводят клетки, популяции клеток или композиции, представляет собой млекопитающее, как правило, примата, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления, примат представляет собой обезьяну или высшую обезьяну. Субъект может иметь мужской или женский пол и может находиться в любом подходящем возрасте, включая младенцев, детей, подростков, взрослых и престарелых субъектов. В некоторых вариантах

осуществления, субъект представляет собой не относящегося к примату животного, такого как грызун.

[0723] В рамках изобретения, «лечение» (и его грамматические варианты, такие как «лечить» или «проведение лечения») относится к полному или частичному облегчению или уменьшению заболевания или состояния, или нарушения, или симптома, неблагоприятного эффекта или исхода, или ассоциированного с ними фенотипа. Желательные эффекты лечения включают, но без ограничения, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или опосредованных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, облегчение или смягчение состояния заболевания, и ремиссию или улучшение прогноза. Термины не подразумевают полного излечения заболевания или полного прекращения любого симптома или эффекта(эффектов) всех симптомов или исходов.

[0724] В рамках изобретения, «задержка развития заболевания» означает отсрочку, затруднение, замедление, сдерживание, стабилизацию, супрессию и/или отдаление развития заболевания (такого как злокачественная опухоль). Эта задержка может составлять различные периоды времени, в зависимости от анамнеза заболевания и/или индивидуума, подвергаемого лечению. Как очевидно для специалиста в данной области, достаточная или значительная, задержка может, фактически, включать предотвращение, в том плане, что у индивидуума не развивается заболевание. Например, может быть задержана поздняя стадия злокачественной опухоли, такая как развитие метастазирования.

[0725] «Предотвращение», в рамках изобретения, включает обеспечение профилактики, применительно к возникновению или рецидиву заболевания у субъекта, который может иметь предрасположенность к заболеванию, но у которого еще не диагностировано заболевание. В некоторых вариантах осуществления, представленные клетки и композиции используют для задержки развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания.

[0726] В рамках изобретения, «супрессия» функции или активности представляет собой снижение функции или активности, по сравнению с одинаковыми в ином отношении состояниями, за исключением представляющего интерес условия или параметра, или альтернативно, по сравнению с другим состоянием. Например, клетки, супрессирующие рост опухоли, уменьшают скорость роста опухоли, по сравнению со скоростью роста опухоли в отсутствие клеток.

[0727] «Эффективное количество» средства, например, фармацевтического состава, клеток или композиции, в контексте введения, относится к количеству, эффективному, в дозах/количествах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желательного результата, такого как терапевтический или профилактический результат.

[0728] «Терапевтически эффективное количество» средства, например, фармацевтического состава или клеток, относится к количеству, эффективному, в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желательного

терапевтического результата, например, для лечения заболевания, состояния или нарушения, и/или фармакокинетического или фармакодинамического эффекта лечения. Терапевтически эффективное количество может меняться в соответствии с такими факторами, как состояние заболевания, возраст, пол и масса субъекта, и вводимые популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы включают введение клеток и/или композиций в эффективных количествах, например, терапевтически эффективных количествах.

[0729] «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному, в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желательного профилактического результата. Как правило, но необязательно, поскольку профилактическую дозу используют у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество может быть менее, чем терапевтически эффективное количество.

[0730] Заболевание или состояние, подвергаемое лечению, может представлять собой любое, при котором экспрессия антигена является ассоциированной с и/или вовлеченной в этиологию заболевания, состояния или нарушения, например, вызывает, обостряет или иным образом вовлечена в такое заболевание, состояние или нарушение. Иллюстративные заболевания и состояния могут включать заболевания или состояния, ассоциированные с злокачественным новообразованием или трансформацией клеток (например, злокачественную опухоль), аутоиммунное или воспалительное заболевание, или инфекционное заболевание, например, вызванное бактериальным, вирусным или другим патогеном. Иллюстративные антигены, которые включают антигены, ассоциированные с другими заболеваниями и состояниями, которые можно подвергать лечению, описаны выше. В конкретных вариантах осуществления, химерный рецептор антигена или трансгенный TCR специфически связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или состоянием.

[0731] Таким образом, представленные способы и применения включают способы и применения для адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение клеток или композиции, содержащей клетки, субъекту, в ткань или клетку, например, в имеющие, подверженные риску или, как подозревают, имеющие заболевание, состояние или нарушение. В некоторых вариантах осуществления, клетки, популяции и композиции вводят субъекту, имеющему конкретное заболевание или состояние, подлежащее лечению, например, посредством адоптивной клеточной терапии, такой как адоптивная Т клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления, клетки или композиции вводят субъекту, такому как субъект, имеющий или подверженный риску заболевания или состояния, для облегчения одного или нескольких симптомов заболевания или состояния.

[0732] В некоторых вариантах осуществления, клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют посредством аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, подлежащего

проведению клеточной терапии, или из образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах, клетки получают от субъекта, например, пациента, нуждающегося в лечении, и клетки, после выделения и переработки, вводят тому же самому субъекту.

[0733] В некоторых вариантах осуществления, клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют посредством аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, отличного от субъекта, подлежащего проведению клеточной терапии или в конечном счете подлежащего проведению клеточной терапии, например, первого субъекта. В таких вариантах осуществления, клетки затем вводят другому субъекту, например, второму субъекту, того же вида. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй субъекты являются генетически идентичными. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй субъекты являются генетически сходными. В некоторых вариантах осуществления, второй субъект экспрессирует HLA такого же класса или супертипа, что и первый субъект. Клетки можно вводить посредством любых пригодных способов. Дозирование и введение могут частично зависеть от того, является ли введение кратким или хроническим. Различные расписания дозирования включают, но без ограничения, однократное или множественные введения в различных временных точках, болюсное введение и импульсную инфузию.

[0734] В конкретных вариантах осуществления, клетки или индивидуальные популяции подтипов клеток вводят субъекту в диапазоне от приблизительно одного миллиона до приблизительно 100 миллиардов клеток и/или в количестве клеток на килограмм массы тела, например, таком как от 1 миллиона до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 5 миллионов клеток, приблизительно 25 миллионов клеток, приблизительно 500 миллионов клеток, приблизительно 1 миллиард клеток, приблизительно 5 миллиардов клеток, приблизительно 20 миллиардов клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 40 миллиардов клеток, или в диапазоне, определяемом любыми двумя из предшествующих значений), например, от приблизительно 10 миллионов до приблизительно 100 миллиардов клеток (например, приблизительно 20 миллионов клеток, приблизительно 30 миллионов клеток, приблизительно 40 миллионов клеток, приблизительно 60 миллионов клеток, приблизительно 70 миллионов клеток, приблизительно 80 миллионов клеток, приблизительно 90 миллионов клеток, приблизительно 10 миллиардов клеток, приблизительно 25 миллиардов клеток, приблизительно 50 миллиардов клеток, приблизительно 75 миллиардов клеток, приблизительно 90 миллиардов клеток, или в диапазоне, определяемом любыми двумя из предшествующих значений), и в некоторых случаях, от приблизительно 100 миллионов клеток до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 120 миллионов клеток, приблизительно 250 миллионов клеток, приблизительно 350 миллионов клеток, приблизительно 450 миллионов клеток, приблизительно 650 миллионов клеток, приблизительно 800 миллионов клеток,

приблизительно 900 миллионов клеток, приблизительно 3 миллиарда клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 45 миллиардов клеток) или в любом количестве в пределах этих диапазонов и/или на килограмм массы тела. И снова, дозы можно менять, в зависимости от признаков, характерных для заболевания или нарушения, и/или пациента, и/или других видов лечения. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят в качестве части комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством, например, с антителом или модифицированной клеткой или рецептором, или средством, таким как цитотоксическое или лекарственное средство. Клетки, в некоторых вариантах осуществления, вводят совместно с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами или в сочетании с другим терапевтическим вмешательством, либо одновременно, либо последовательно, в любом порядке. В некоторых контекстах, клетки вводят совместно с другой терапией, достаточно близко по времени, таким образом, что популяции клеток усиливают эффект одного или нескольких дополнительных лекарственных средств, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят перед одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят после одного или нескольких дополнительных лекарственных средств. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько дополнительных средств включают цитокин, такой как IL-2, например, для улучшения персистенции. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение химиотерапевтического средства.

[0735] После введения клеток, биологическую активность модифицированных популяций клеток в некоторых вариантах осуществления, измеряют, например, посредством любого из ряда известных способов. Параметры для оценки включают специфическое связывание модифицированной или природной Т-клетки или другого иммуноцита с антигеном, *in vivo*, например, посредством визуализации, или *ex vivo*, например, посредством ELISA или проточной цитометрии. В конкретных вариантах осуществления, способность модифицированных клеток разрушать клетки-мишени можно измерять с использованием любого пригодного способа, известного в данной области, такого как анализы цитотоксичности, описанные, например, в Kochenderfer et al., *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009), и Herman et al. *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004). В конкретных вариантах осуществления, биологическую активность клеток измеряют посредством анализа экспрессии и/или секреции одного или нескольких цитокинов, таких как CD 107a, IFN γ , IL-2 и TNF. В некоторых аспектах, биологическую активность измеряют посредством оценки клинического исхода, такого как уменьшение опухолевой нагрузки/или массы.

[0736] В конкретных вариантах осуществления, модифицированные клетки дополнительно модифицируют любым количеством способов, так что их терапевтическая или профилактическая эффективность увеличивается. Например, сконструированный CAR или TCR, экспрессируемый в популяции, можно конъюгировать, либо напрямую,

либо опосредованно через линкер, с нацеливающей группой. Практическое осуществление конъюгации соединений, например, CAR или TCR, с нацеливающими группами известны в данной области. См., например, Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 1 1 1 (1995) и Патент США 5087616.

VI. Устройство и изделия

[0737] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится также к устройству или изделию. Настоящее изобретение относится к устройству, включающего стационарную фазу, представляющую собой матрикс для аффинной хроматографии, для осуществления любых из представленных способов. В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза содержится в хроматографической колонке. Аранжировка может дополнительно содержать вторую стационарную фазу, соединенную, с возможностью переноса жидкости, с первой стационарной фазой. Вторичная стационарная фаза может представлять собой матрикс для гель-фильтрации и/или матрикс для аффинной хроматографии, где матрикс для гель-фильтрации и/или аффинной хроматографии содержит реагент для отбора, таким образом, являясь пригодным для иммобилизации реагента для мультимеризации на стационарной фазе. Этот тип аранжировки может облегчать последовательный отбор клеток-мишеней (например, Т-клеток, CD4, CD3, CD8 Т-клеток), где одна из колонок также является пригодной для стимуляции на колонке, как описано в настоящем описании.

[0738] В некоторых вариантах осуществления, устройство имеет аранжировку, включающую стационарную фазу, представляющую собой матрикс для аффинной хроматографии, для хроматографии (например, хроматографии на колонке). В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза имеет реагент для отбора, такой как описано в настоящем описании, иммобилизованный на ней. В некоторых вариантах осуществления, аранжировка включает две такие стационарные фазы для аффинной хроматографии (например, хроматографии на колонке), параллельно для отбора и стимуляции на колонке, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, аранжировка включает две такие стационарные фазы для аффинной хроматографии (например, хроматографии на колонке) для последовательного отбора и стимуляции на колонке, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, аранжировка включает более, чем две колонки, которые могут быть аранжированы для проведения параллельного и последовательного отбора, стимуляции на колонке или окончательной очистки. Например, две колонки параллельно могут быть аранжированы таким образом, что выход из колонок подают в колонку для последовательного отбора.

[0739] В некоторых вариантах осуществления, устройство имеет аранжировку стационарных фаз (например, как описано выше) и устройство (например, камеру для центрифугирования) для промывки и трансдукции отобранных и стимулированных клеток, собранные из стационарных фаз.

[0740] Изобретение, кроме того, относится, в некоторых вариантах осуществления, к устройству для очистки (например, отбора и стимуляции на колонке) и культивирования, например, стимуляции или размножения, композиции клеток, содержащему по меньшей мере одну аранжировку биореактора и первой стационарной фазы или второй стационарной фазы для хроматографии, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к аранжировке стационарной фазы для хроматографии и биореактора. Биореактор является пригодным для размножения клеток, и стационарная фаза является пригодной для разделения клеток и стимуляции на колонке. Например, отобранные и стимулированные клетки из стационарной фазы можно промывать, трансдуцировать и помещать в биореактор для размножения. В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза представляет собой матрикс для гель-фильтрации и/или матрикс для аффинной хроматографии, где матрикс для гель-фильтрации и/или аффинной хроматографии содержит реагент для отбора, где реагент для отбора содержит участок связывания Z1, специфически связывающий партнер по связыванию C1, содержащийся в средстве для отбора, и/или реагент для отбора содержит участок связывания Z2, специфически связывающий партнер по связыванию C2, содержащийся во втором средстве для отбора. Стационарная фаза, таким образом, является пригодной для иммобилизации на ней первого средства для отбора и/или второго средства для отбора, первого партнера по связыванию C1 и/или второго партнера по связыванию C2. Кроме того, биореактор и стационарная фаза соединены с возможностью переноса жидкости. В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза может быть соединена с биореактором через устройство для стадий промывки и трансдукции. Эту аранжировку можно использовать для серийного размножения и можно встраивать в известные системы для размножения клеток, такие как система для размножения клеток Quantum® или система для размножения клеток Xuri W25. В некоторых вариантах осуществления, биореактор соединен с устройством, например, но без ограничения, Ovizio iLine F (Ovizio Imaging Systems NV/SA, Brussels, Belgium), для мониторинга общего состояния и фенотипа клеток (см. раздел I-E-3a).

[0741] В некоторых вариантах осуществления, аранжировка дополнительно включает стационарные фазы для окончательной очистки (см., например, раздел I-I). В некоторых вариантах осуществления, стационарные фазы представляют собой матрикс для аффинной хроматографии, для хроматографии (например, хроматографии на колонке). В некоторых вариантах осуществления, стационарные фазы для окончательной очистки имеют реагент для отбора, такой как описанный в настоящем описании, иммобилизованный на нем, для облегчения отбора клеток. В некоторых вариантах осуществления, аранжировка дополнительно включает устройство (например, камеру для центрифугирования) для промывки, составления и заполнения терапевтической композиции в пригодные контейнеры, например, как описано в настоящем описании.

[0742] В некоторых вариантах осуществления, компоненты аранжировки соединены посредством трубок. В некоторых вариантах осуществления, компоненты

аранжировки соединены посредством сварки. В некоторых вариантах осуществления, соединения (например, трубки и/или сварка) между компонентами аранжировки являются стерильными.

[0743] В некоторых вариантах осуществления, аранжировка воплощена в устройстве. Устройство может дополнительно содержать множество аранжировок биореактора и стационарной фазы, соединенных, с возможностью переноса жидкости, в сериях.

Устройство может содержать вход образца, соединенный, с возможностью переноса жидкости, со стационарной фазой для хроматографии (например, отбора и стимуляции на колонке). Устройство может также содержать выход образца для очищенных (например, отобранных) и стимулированных клеток-мишеней, где выход образца соединен, с возможностью переноса жидкости, со стационарной фазой последней из по меньшей мере одной аранжировки биореактора и стационарной фазы для хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, устройство дополнительно содержит выход, посредством которого модифицированные Т-клетки (например, терапевтическую композицию клеток) можно заполнять в пригодные контейнеры. Наконец, устройство может быть разработано в форме функционально закрытой системы.

VII. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0744] 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.

[0745] В рамках изобретения, формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного. Например, форма единственного числа обозначает «по меньшей мере один» или «один или несколько». Понятно, что аспекты и варианты, описанные в настоящем описании, включают «состоящие» и/или «в основном состоящие из» аспекты и варианты.

[0746] На протяжении этого описания, различные аспекты заявленного объекта изобретения представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона присутствует просто для удобства и краткости, и его не следует рассматривать как жесткое ограничения объема заявленного объекта изобретения. Соответственно, описание диапазона следует рассматривать как конкретно описывающее все возможные поддиапазоны, так же как индивидуальные числовые значения внутри этого диапазона. Например, когда представлен диапазон значений, понятно, что каждое промежуточное значение, между верхним и нижним пределами этого диапазона, и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне включено

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

[0747] 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».

[0748] 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).

[0749] 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, гаммаретровирусные, и лентивирусные векторы.

[0750] 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.

[0751] 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.

[0752] 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.

[0753] 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.

[0754] 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.

[0755] 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.

[0756] 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.

[0757] 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.

[0758] В рамках изобретения, «субъект» представляет собой млекопитающее, такое как человек или другое животное, и как правило, представляет собой человека.

VIII. ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0759] Среди представленных вариантов осуществления присутствуют:

1. Способ стимуляции на колонке Т-клеток, включающий:

(а) инкубацию множества Т-клеток, иммобилизованных на стационарной фазе, с одним или несколькими стимулирующими средствами для доставки стимулирующего

сигнала одной или несколькими Т-клеткам из множества Т-клеток, где указанная стационарная фаза содержит средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток, где специфическое связывание средства для отбора с селективным маркером, экспрессированным одной или несколькими Т-клетками, вызывает иммобилизацию одной или нескольких Т-клеток на стационарной фазе; и

(b) в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести без добавления конкурентного средства или свободного связывающего средства для элюции множества Т-клеток из стационарной фазы, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

2. Способ из варианта осуществления 1, где стационарная фаза содержит по меньшей мере одно из одного или нескольких стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольким Т-клеткам.

3. Способ из варианта осуществления 2, где по меньшей мере одно стимулирующее средство представляет собой первое стимулирующее средство, и стационарная фаза дополнительно содержит одно или несколько из вторых стимулирующих средств, способных усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал первого стимулирующего средства.

4. Способ из варианта осуществления 2, где стимулирующее средство представляет собой первое стимулирующее средство, и при этом, до инкубации, добавляют к стационарной фазе стимулирующий реагент, содержащий одно или несколько из вторых стимулирующих средств, способных усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал первого стимулирующего средства.

5. Способ из варианта осуществления 1, где, до инкубации, добавляют стимулирующий реагент к стационарной фазе, где указанный стимулирующий реагент содержит по меньшей мере одно из одного или нескольких стимулирующих средств.

6. Способ из варианта осуществления 5, где по меньшей мере одно стимулирующее средство представляет собой первое стимулирующее средство, и одно или несколько стимулирующих средств дополнительно содержит одно или несколько из вторых стимулирующих средств, способных усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал первого стимулирующего средства.

7. Способ из любого из вариантов осуществления 1-6, где по меньшей мере одно из одного или нескольких стимулирующих средств, необязательно, первое стимулирующее средство, является способным доставлять стимулирующий сигнал, где стимулирующий сигнал передается через комплекс TCR/CD3 в Т-клетке, содержащий CD3 комплекс в Т-клетке и/или содержащую ИТАМ молекулу в Т-клетке.

8. Способ из любого из вариантов осуществления 3, 4, 6 и 7, где второе стимулирующее средство является способным специфически связывать костимулирующую молекулу на одной или нескольких Т-клетках.

9. Способ стимуляции на колонке Т-клеток, включающий:

(а) добавление образца, содержащего множество Т-клеток, к стационарной фазе, где указанная стационарная фаза содержит средство для отбора, которое связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких из множества Т-клеток, таким образом, иммобилизацию одной или нескольких из множества Т-клеток на стационарной фазе;

(b) добавление, со стационарной фазой, стимулирующего реагента, содержащего одно или несколько стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольких из указанного множества Т-клеток, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками; и

(с) в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из указанного множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести без добавления конкурентного средства или свободного связывающего средства для элюции множества Т-клеток из стационарной фазы, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

10. Способ стимуляции на колонке Т-клеток, включающий:

(1) объединение (а) образца, содержащего множество Т-клеток, и (b) стационарной фазы, содержащей средство для отбора, способное специфически связывать селективный маркер, экспрессированный на поверхности одной или нескольких из множества Т-клеток, где специфическое связывание средства для отбора с селективным маркером вызывает иммобилизацию указанного множества Т-клеток на стационарной фазе;

(2) добавление, со стационарной фазой, стимулирующего реагента, содержащего одно или несколько стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал Т-клеткам, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками; и

(3) в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из указанного множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести без добавления конкурентного средства или свободного связывающего средства для элюции множества Т-клеток из стационарной фазы, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

11. Способ стимуляции на колонке Т-клеток, включающий добавление олигомерного стимулирующего реагента к стационарной фазе, содержащей множество иммобилизованных Т-клеток, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками из множества иммобилизованных Т-клеток, где:

стационарная фаза содержит средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток, где специфическое связывание средства для отбора с селективным маркером, экспрессированным одной или несколькими Т-клетками, вызывает иммобилизацию указанной одной или нескольких Т-клеток на стационарной фазе; и

олигомерный стимулирующий реагент содержит (i) множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и (ii) одно или несколько стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольким Т-клеткам, где размер олигомерного стимулирующего реагента включает i) радиус более чем 50 нм, ii) молекулярную массу по меньшей мере 5×10^6 г/моль; и/или (iii) по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина на олигомерный стимулирующий реагент.

12. Способ из варианта осуществления 11, дополнительно включающий, в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести без добавления конкурентного средства или свободного связывающего средства для элюции множества Т-клеток из стационарной фазы, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

13. Способ из любого из вариантов осуществления 1-10 или 12, где сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах приблизительно 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 часов от начала инкубации.

14. Способ из любого из вариантов осуществления 1-10, 12, или 13, где сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах приблизительно 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 7-24, 8-24, 9-24, 10-24, 11-24, 12-24, 13-24, 14-24, 15-24, 16-24, 17-24, 18-24, 19-24, 20-24, 21-24, 22-24, 23-24, 2-23, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 или 2-3 часов от начала инкубации.

15. Способ из любого из вариантов осуществления 1-10 или 12-14, где сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах приблизительно 12, 10, 8, 6, 4 или 2 часов от начала инкубации.

16. Способ из любого из вариантов осуществления 1-10 или 12-15, где сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах 5 часов от начала инкубации.

17. Способ из любого из вариантов осуществления 1-10 или 12-16, где сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах 4 часов от начала инкубации.

18. Способ из любого из вариантов осуществления 9, 10 и 13-17, где начало инкубации со стимулирующим реагентом происходит в пределах точно или приблизительно 10 минут, в пределах точно или приблизительно 20 минут, в пределах точно или приблизительно 30 минут, в пределах точно или приблизительно 45 минут, в пределах точно или приблизительно 60 минут, в пределах точно или приблизительно 90 минут или в пределах точно или приблизительно 120 минут после добавления или объединения образца, содержащего множество Т-клеток, к стационарной фазе или со стационарной фазой.

19. Способ из любого из вариантов осуществления 9-18, где по меньшей мере одно из одного или нескольких стимулирующих средств является способным доставлять стимулирующий сигнал, где стимулирующий сигнал передается через комплекс TCR/CD3 в Т-клетке, содержащий CD3 комплекс в Т-клетке и/или содержащую ИТАМ молекулу в Т-клетке.

20. Способ из варианта осуществления 19, где по меньшей мере одно стимулирующее средство представляет собой первое стимулирующее средство и стимулирующий реагент дополнительно содержит одно или несколько из вторых стимулирующих средств, способных усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал первого стимулирующего средства.

21. Способ из любого из вариантов осуществления 3, 4, 6, 7, и 20, где второе стимулирующее средство является способным специфически связывать костимулирующую молекулу на одной или нескольких Т-клетках.

22. Способ из варианта осуществления 21, где костимулирующая молекула выбрана среди CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 или HVEM.

23. Способ из варианта осуществления 21 или варианта осуществления 22, где второе стимулирующее средство является способным специфически связывать CD28.

24. Способ из любого из вариантов осуществления 3, 4, 6, 7 и 20-23, где первое стимулирующее средство специфически связывает CD3, и второе стимулирующее средство специфически связывает CD28.

25. Способ из любого из вариантов осуществления 1-24, где:

стимулирующее средство представляет собой или содержит средство, выбранное из группы, состоящей из фрагментов антител, одновалентных фрагментов антител, белковых связывающих молекул с иммуноглобулиноподобными функциями, молекул, содержащих домены Ig, цитокинов, хемокинов, аптамеров, молекул МНС, комплексов МНС-пептид; лигандов рецепторов; и их связывающих фрагментов; и/или

стимулирующее средство содержит фрагмент антитела;

стимулирующее средство представляет собой или содержит фрагмент Fab;

стимулирующее средство выбрано из группы из двухвалентных фрагментов антител, состоящей из (Fab)₂'-фрагментов и двухвалентных одноцепочечных фрагментов Fv (scFv);

стимулирующее средство представляет собой одновалентный фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, фрагментов Fv и scFv; и/или

стимулирующее средство представляет собой белковую связывающую молекулу с антителоподобными связывающими свойствами, выбранную из группы, состоящей из аптамеров, мутеинов на основе полипептида из семейства липокалинов, глутел, белков на основе анкиринового каркаса, белков на основе кристаллинового каркаса, аднектинов и авимеров.

26. Способ из любого из вариантов осуществления 3, 4, 6, 7 или 20-24, где:

первое и второе стимулирующие средства независимо представляют собой или содержат средство, выбранное из группы, состоящей из фрагментов антител, одновалентных фрагментов антител, белковых связывающих молекул с иммуноглобулиноподобными функциями, молекул, содержащих домены Ig, цитокинов, хемокинов, аптамеров, молекул МНС, комплексов МНС-пептид; лигандов рецепторов; и их связывающих фрагментов; и/или

первое и второе стимулирующие средства независимо содержат фрагмент антитела;

первое и второе стимулирующие средства независимо представляют собой или содержат фрагмент Fab;

первое и второе стимулирующие средства независимо выбраны из группы из двухвалентных фрагментов антител, состоящей из (Fab)₂'-фрагментов и двухвалентных одноцепочечных фрагментов Fv (scFv);

первое и второе стимулирующие средства независимо представляют собой одновалентный фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, фрагментов Fv и scFv; и/или

первое и второе стимулирующие средства независимо представляют собой белковую связывающую молекулу с антителоподобными связывающими свойствами, выбранную из группы, состоящей из аптамеров, мутеинов на основе полипептида из семейства липокалинов, глутел, белков на основе анкиринового каркаса, белков на основе кристаллинового каркаса, аднектинов и авимеров.

27. Способ из любого из вариантов осуществления 3, 4, 6, 7, 20-24 и 26, где первый стимулирующий реагент представляет собой Fab против CD3, и второе стимулирующее средство представляет собой Fab против CD28.

28. Способ стимуляции на колонке Т-клеток, включающий добавление олигомерного стимулирующего реагента, способного доставлять стимулирующий сигнал Т-клеткам, к стационарной фазе, содержащей множество иммобилизованных Т-клеток, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками, где:

стационарная фаза содержит средство для отбора, способное специфически связывать селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток или их подгруппы, где специфическое связывание средства для отбора с селективным маркером, экспрессированным одной или несколькими Т-клетками или их подгруппой, вызывает иммобилизацию указанного по меньшей мере множества Т-клеток на стационарной фазе, и где средство для отбора представляет собой фрагмент Fab, способный специфически связывать селективный маркер выбранный из группы, состоящей из CD3, CD4, и CD8;

олигомерный стимулирующий реагент содержит (i) множество молекул мутеина стрептавидина, (ii) первое стимулирующее средство, способное доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольким Т-клеткам, где первое стимулирующее средство представляет собой фрагмент Fab, способный специфически связывать CD3, и

(iii) второе стимулирующее средство, способное усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал, где второе стимулирующее средство представляет собой фрагмент Fab, способный специфически связывать CD28, и где размер олигомерного стимулирующего реагента включает i) радиус более чем 50 нм, ii) молекулярную массу по меньшей мере 5×10^6 г/моль; и/или (iii) по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина на олигомерный стимулирующий реагент; и

в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести без добавления конкурентного средства или свободного связывающего средства для элюции множества Т-клеток из стационарной фазы, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

29. Способ из варианта осуществления 25, где:

стимулирующее средство дополнительно содержит биотин, аналог биотина, который обратимо связывает стрептавидин или авидин, связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19), связывающий кальмодулин пептид, который обратимо связывает кальмодулин, пептид FLAG, который обратимо связывает антитело, связывающее пептид FLAG, и олигогистидиновую метку, которая обратимо связывает антитело, связывающее олигогистидиновую метку.

30. Способ из 26, где:

первое стимулирующее средство и второе стимулирующее средство, независимо, дополнительно содержат биотин, аналог биотина, который обратимо связывает стрептавидин или авидин, связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19), связывающий кальмодулин пептид, который обратимо связывает кальмодулин, пептид FLAG, который обратимо связывает антитело, связывающее пептид FLAG, и олигогистидиновую метку, которая обратимо связывает антитело, связывающее олигогистидиновую метку.

31. Способ из любого из вариантов осуществления 1-30, где средство для отбора представляет собой или содержит средство, выбранное из группы, состоящей из фрагментов антител, одновалентных фрагментов антител, белковых связывающих молекул с иммуноглобулиноподобными функциями, молекул, содержащих домены Ig, цитокинов, хемокинов, аптамеров, молекул МНС, комплексов МНС-пептид; лигандов рецепторов; и их связывающих фрагментов; и/или

средство для отбора содержит фрагмент антитела;

средство для отбора представляет собой или содержит фрагмент Fab;

средство для отбора выбрано из группы из двухвалентных фрагментов антител, состоящей из (Fab)₂'-фрагментов и двухвалентных одноцепочечных фрагментов Fv (scFv);

средство для отбора представляет собой одновалентный фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, фрагментов Fv и scFv; и/или

средство для отбора представляет собой белковую связывающую молекулу с антителоподобными связывающими свойствами, выбранную из группы, состоящей из аптамеров, мутеинов на основе полипептида из семейства липокалинов, глутел, белков на основе анкиринового каркаса, белков на основе кристаллинового каркаса, аднектинов и авимеров.

32. Способ из варианта осуществления 31, где:

средство для отбора дополнительно содержит биотин, аналог биотина, который обратимо связывает стрептавидин или авидин, связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19), связывающий кальмодулин пептид, который обратимо связывает кальмодулин, пептид FLAG, который обратимо связывает антитело, связывающее пептид FLAG, и олигогистидиновую метку, которая обратимо связывает антитело, связывающее олигогистидиновую метку.

33. Способ из любого из вариантов осуществления 1-32, где:

селективный маркер представляет собой Т-клеточный корецептор;

селективный маркер представляет собой или содержит член комплекса Т-клеточного рецептора антигена;

селективный маркер представляет собой или содержит цепь CD3;

селективный маркер представляет собой или содержит цепь CD3-дзета;

селективный маркер представляет собой или содержит CD8;

селективный маркер представляет собой или содержит CD4;

селективный маркер представляет собой или содержит CD45RA;

селективный маркер представляет собой или содержит CD27;
селективный маркер представляет собой или содержит CD28; и/или
селективный маркер представляет собой или содержит CCR7.

34. Способ из любого из вариантов осуществления 1-33, где специфическое связывание между средством для отбора и селективным маркером не индуцирует сигнал, или не индуцирует стимулирующий или активирующий или пролиферативный сигнал, для Т-клеток.

35. Способ из любого из вариантов осуществления 1-34, где средство для отбора представляет собой Fab против CD3, Fab против CD8 или Fab против CD4.

36. Способ из любого из вариантов осуществления 2 и 5-35, где указанный стимулирующий реагент является растворимым.

37. Способ из любого из вариантов осуществления 2 и 5-36, где:
стимулирующий реагент не является растворимым и не является связанным с или ассоциированным с твердой подложкой, стационарной фазой, бусиной, микрочастицей, магнитной частицей и/или матриксом; и/или

реагент является гибким, не содержит металлический или магнитный кор, состоит полностью или преимущественно из органического мультимера, не является сферическим, не является по существу сферическим или единообразным по форме, и/или не является жестким.

38. Способ из любого из вариантов осуществления 2 и 5-10, и 12-37, где стимулирующий реагент представляет собой или содержит стрептавидин, авидин, мутеин стрептавидина, который обратимо связывает биотин, аналог биотина или его биологически активный фрагмент; мутеин авидина или стрептавидина, который обратимо связывает связывающий стрептавидин пептид; реагент, который содержит по меньшей мере две хелатирующие группы К, где по меньшей мере две хелатирующие группы являются способными связывать ион переходного металла; средство, способное связывать олигогистидиновую аффинную метку; средство, способное связывать глутатион-S-трансферазу; кальмодулин или его аналог; средство, способное связывать связывающий кальмодулин пептид (CBP); средство, способное связывать FLAG-пептид; средство, способное связывать HA-метку; средство, способное связывать связывающий мальтозу белок (MBP); средство, способное связывать эпитоп HSV; средство, способное связывать эпитоп тус; или средство, способное связывать биотинилированный белок-носитель.

39. Способ из любого из вариантов осуществления 2, 5-10 и 12-38, где:
стимулирующий реагент представляет собой или содержит мутеин стрептавидина или мутеин авидина, который обратимо связывает биотин или биологически активный фрагмент;

стимулирующий реагент представляет собой или содержит мутеин стрептавидина или мутеин авидина, который обратимо связывает аналог биотина или биологически активный фрагмент; и/или

стимулирующий реагент представляет собой или содержит мутеин стрептавидина или мутеин авидина, который обратимо связывает связывающий стрептавидин пептид.

40. Способ из любого из вариантов осуществления 2, 5-10, и 12-39, где стимулирующий реагент представляет собой олигомерный стимулирующий реагент, содержащий множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, где размер частицы олигомерного стимулирующего реагента включает i) радиус более чем 50 нм, ii) молекулярную массу по меньшей мере 5×10^6 г/моль; и/или (iii) по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина на частицу олигомерного стимулирующего реагента.

41. Способ из варианта осуществления 11 или варианта осуществления 40, где олигомерный стимулирующий реагент является растворимым.

42. Способ из любого из вариантов осуществления 11, 40, или 41, где:

олигомерный стимулирующий реагент не является растворимым и не является связанным с или ассоциированным с твердой подложкой, стационарной фазой, бусиной, микрочастицей, магнитной частицей и/или матриксом; и/или

реагент является гибким, не содержит металлический или магнитный кор, состоит полностью или преимущественно из органического мультимера, и/или не является жестким.

43. Способ из любого из вариантов осуществления 11 или 40-42, где молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина обратимо связывают или являются способными обратимо связывать биотин, аналог биотина или связывающий стрептавидин пептид.

44. Способ из любого из вариантов осуществления 38-43, где:

мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ или Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47, со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:1; или

мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47, со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 1.

45. Способ из любого из вариантов осуществления 38, 39, 43 или 44, где связывающий стрептавидин пептид выбран из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19).

46. Способ из любого из вариантов осуществления 11 или 40-45, где частица олигомерного реагента имеет:

радиус более чем 60 нм, более чем 70 нм, более чем 80 нм, или более чем 90 нм.

47. Способ из любого из вариантов осуществления 11 или 40-46, где частица олигомерного реагента имеет:

радиус между 50 нм и 150 нм, между 75 нм и 125 нм, между 80 нм и 115 нм, или между 90 нм и 110 нм, включительно; или

радиус $90 \text{ нм} \pm 15 \text{ нм}$ или $95 \text{ нм} \pm 20\text{-}25 \text{ нм}$.

48. Способ из любого из вариантов осуществления 11 или 40-47, где радиус представляет собой гидродинамический радиус.

49. Способ из любого из вариантов осуществления 11 или 40-48, где частица олигомерного реагента имеет молекулярную массу:

по меньшей мере 5×10^7 г/моль, или по меньшей мере 1×10^8 г/моль; и/или

между 5×10^7 г/моль и 5×10^8 г/моль, между 1×10^8 г/моль и 5×10^8 г/моль, или между 1×10^8 г/моль и 2×10^8 г/моль.

50. Способ из любого из вариантов осуществления 11 или 40-49, где частица олигомерного реагента содержит по меньшей мере 500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере 1000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере 1500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, или по меньшей мере 2000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина; и/или;

между 1000 и 20000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, между 1000 и 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, или между 2000 и 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина.

51. Способ из любого из вариантов осуществления 1-50, где средство для отбора напрямую или опосредованно связано со стационарной фазой.

52. Способ из любого из вариантов осуществления 1-51, где средство для отбора связано опосредованно со стационарной фазой посредством реагента для отбора, с которым средство для отбора обратимо связывается.

53. Способ из варианта осуществления 51 или варианта осуществления 52, где реагент для отбора представляет собой или содержит стрептавидин, авидин, мутеин стрептавидина, который обратимо связывает биотин, аналог биотина или его биологически активный фрагмент; мутеин авидина или стрептавидина, который обратимо связывает связывающий стрептавидин пептид; реагент, который содержит по меньшей мере две хелатирующие группы К, где по меньшей мере две хелатирующие группы являются способными связывать ион переходного металла; средство, способное связывать олигогистидиновую аффинную метку; средство, способное связывать глутатион-S-трансферазу; кальмодулин или его аналог; средство, способное связывать связывающий кальмодулин пептид (CBP); средство, способное связывать FLAG-пептид; средство, способное связывать НА-метку; средство, способное связывать связывающий мальтозу белок (MBP); средство, способное связывать эпитоп HSV; средство, способное связывать эпитоп тус; или средство, способное связывать биотинилированный белок-носитель.

54. Способ из любого из вариантов осуществления 51-53, где:

реагент для отбора представляет собой или содержит мутеин стрептавидина или мутеин авидина, который обратимо связывает биотин или биологически активный фрагмент;

стимулирующий реагент представляет собой или содержит мутеин стрептавидина или мутеин авидина, который обратимо связывает аналог биотина или биологически активный фрагмент; и/или

стимулирующий реагент представляет собой или содержит мутеин стрептавидина или мутеин авидина, который обратимо связывает связывающий стрептавидин пептид.

55. Способ из варианта осуществления 53 или варианта осуществления 54, где молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина обратимо связывают или являются способными обратимо связывать биотин, аналог биотина или связывающий стрептавидин пептид.

56. Способ из любого из вариантов осуществления 53-55, где:

мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ или Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47., со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:1; или

мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47., со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 1.

57. Способ из любого из вариантов осуществления 53-54, где связывающий стрептавидин пептид выбран из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), SAWSHHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHHPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19).

58. Способ из любого из вариантов осуществления 1-10 или 12-57, где указанный сбор включает промывку стационарной фазы средами, не содержащими конкурентное средство или свободное связывающее средство для элюции Т-клеток из стационарной фазы.

59. Способ из любого из вариантов осуществления 1-10 или 12-58, включающий, после указанного сбора, дополнительную инкубацию композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

60. Способ из варианта осуществления 59, где:

дополнительную инкубацию проводят при точно или приблизительно 37 °C±2 °C; и/или дополнительную инкубацию проводят в присутствии дополнительного средства, способного доставлять сигнал Т-клеткам.

61. Способ из варианта осуществления 60, где дополнительное средство содержится в средах, используемых для промывки стационарной фазы.

62. Способ из варианта осуществления 60 или 61, где дополнительное средство является способным усиливать или индуцировать пролиферацию Т-клеток, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток.

63. Способ из любого из вариантов осуществления 60-62, где дополнительное средство представляет собой цитокин, выбранный среди IL-2, IL-15 и IL-7.

64. Способ из любого из вариантов осуществления 59-63, где дополнительную инкубацию проводят в течение времени, составляющего 72 часа, не более чем 48 часов, не более чем 24 часов, или не более чем 12 часов.

65. Способ из любого из вариантов осуществления 1-64, дополнительно включающий введение рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты в стимулированные Т-клетки из композиции, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует рекомбинантный белок, таким образом, получение композиции, содержащей трансдуцированные Т-клетки.

66. Способ из варианта осуществления 65, где рекомбинантный белок представляет собой рецептор антигена.

67. Способ из варианта осуществления 65, где рекомбинантный белок представляет собой химерный рецептор антигена.

68. Способ из варианта осуществления 67, где химерный рецептор антигена (CAR) содержит внеклеточный узнающий антиген домен, которое специфически связывает антиген-мишень, и внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий ITAM.

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

70. Способ из варианта осуществления 68 или варианта осуществления 69, дополнительно включающий трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный передающий сигналы домен.

71. Способ из варианта осуществления 70, где трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28.

72. Способ из любого из вариантов осуществления 68-71, где внутриклеточный передающий сигналы домен дополнительно содержит внутриклеточный передающий сигналы домен из Т-клеточной костимулирующей молекулы.

73. Способ из варианта осуществления 72, где Т-клеточная костимулирующая молекула выбрана из группы, состоящей из CD28 и 41BB.

74. Способ из любого из вариантов осуществления 65-73, где нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей рекомбинантный рецептор антигена.

75. Способ из любого из вариантов осуществления 65-74, где введение рекомбинантной нуклеиновой кислоты осуществляют посредством трансдукции с использованием вирусной частицы.

76. Способ из варианта осуществления 75, где вирусная частица представляет собой частицу ретровирусного вектора.

77. Способ из варианта осуществления 75, где вирусная частица представляет собой частицу лентивирусного вектора.

78. Способ из любого из вариантов осуществления 65-77, дополнительно включающий культивирование композиции, содержащей трансдуцированные клетки, в условиях для интеграции вируса, таким образом, получение композиции, содержащей культивированные Т-клетки.

79. Способ из любого из вариантов осуществления 75-78, дополнительно включающий культивирование композиции, содержащей трансдуцированные клетки, в условиях для размножения Т-клеток.

80. Способ из варианта осуществления 79, где культивирование проводят в течение времени, составляющего не более чем 14 суток, не более чем 12 суток, не более чем 10 суток, не более чем 8 суток или не более чем 6 суток.

81. Способ из любого из вариантов осуществления 59-64, дополнительно включающий добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства к композиции, содержащей стимулированные Т-клетки, таким образом, разрушение обратной связи(связей).

82. Способ из любого из вариантов осуществления 65-77, дополнительно включающий добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства к композиции, содержащей трансдуцированные Т-клетки, таким образом, разрушение обратной связи(связей).

83. Способ из любого из вариантов осуществления 78-80, дополнительно включающий добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства к композиции, содержащей культивированные Т-клетки, таким образом, разрушение обратной связи(связей).

84. Способ из любого из вариантов осуществления 81-83, где конкурентное средство или свободное связывающее средство не является вредным для Т-клеток, и/или где добавление указанного вещества не уменьшает процент выживания Т-клеток до менее чем 90%, 80%, 70%, 60%, или 50%, по сравнению с инкубацией Т-клеток, в сравнимых или таких же условиях, в отсутствие конкурентного средства или свободного связывающего средства.

85. Способ из любого из вариантов осуществления 81-84, где указанное разрушение прекращает или уменьшает стимулирующий сигнал в Т-клетках.

86. Способ из любого из вариантов осуществления 81-85, где:

конкурентный реагент и свободное связывающее средство независимо содержат молекулу из группы, состоящей из: связывающих стрептавидин молекул; биотина; D-биотина; аналогов биотина; аналогов биотина, которые специфически связывают стрептавидин или аналог стрептавидина, имеющий аминокислотную последовательность Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ или Pe⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ в положениях последовательности,

соответствующих положениям 44-47 стрептавидина дикого типа; и пептидов, содержащих или состоящих из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 5 и 7; или конкурентный реагент и свободное связывающее средство независимо содержат хелатор металла, который, необязательно, представляет собой EDTA или EGTA.

87. Способ из любого из вариантов осуществления 1-77, где Т-клетки содержат антигенспецифические Т-клетки или их популяцию, Т-клетки-помощники или их популяцию, цитотоксические Т-клетки или их популяцию, Т-клетки памяти или их популяцию, или регуляторные Т-клетки или их популяцию.

88. Способ из любого из вариантов осуществления 1-87, где Т-клетки содержат CD3+ Т-клетки или содержат CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

89. Способ из любого из вариантов осуществления 1-88, где стационарная фаза представляет собой или содержит хроматографический матрикс.

90. Изделие для стимуляции Т-клеток на колонке, содержащее:

(а) первое стимулирующее средство и второе стимулирующее средство, способное специфически связывать первую молекулу и вторую молекулу, соответственно, на поверхности Т-клетки, таким образом, стимулировать Т-клетку; и

(б) стационарную фазу, содержащую средство для отбора, способное специфически связывать селективный маркер на Т-клетке, таким образом, иммобилизовать Т-клетку на стационарной фазе.

91. Изделие из варианта осуществления 90, где стационарная фаза дополнительно содержит первое стимулирующее средство и второе стимулирующее средство.

92. Изделие из варианта осуществления 90 или варианта осуществления 91, где первое стимулирующее средство, второе стимулирующее средство и средство для отбора связаны опосредованно со стационарной фазой посредством реагента для отбора.

93. Изделие из варианта осуществления 90, дополнительно содержащее стимулирующий реагент, где первое и второе стимулирующие средства являются обратимо связанными или способными к обратимому связыванию.

94. Способ из варианта осуществления 90, где средство для отбора связано опосредованно со стационарной фазой посредством реагента для отбора.

95. Изделие из любого из вариантов осуществления 90-94, где стационарная фаза представляет собой или содержит хроматографический матрикс, и где изделие дополнительно содержит контейнер, в котором содержится весь или часть хроматографического матрикса.

96. Устройство, содержащее изделие из любого из вариантов осуществления 90-95.

97. Устройство из варианта осуществления 96, дополнительно содержащее выпускное отверстие для жидкости, соединенное, с возможностью переноса жидкости, с одним или несколькими компонентами устройства, и/или выпускное отверстие для жидкости, соединенное, с возможностью переноса жидкости, с одним или несколькими компонентами устройства.

98. Устройство из любого из вариантов осуществления 96 или 97, которое находится в закрытой или стерильной системе.

99. Устройство из любого из вариантов осуществления 96-98, или изделие из любого из вариантов осуществления 90-95, для использования в способе из любого из вариантов осуществления 1-89, где способ, необязательно, осуществляют автоматизированным образом.

IX. ПРИМЕРЫ

[0760] Следующие примеры включены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1: Способы получения конъюгированного с Fab против CD3/против CD28 олигомерного реагента, содержащего мутеин стрептавидина.

[0761] Олигомерный реагент получали посредством полимеризации иллюстративного мутеина стрептавидина, обозначенного STREP-TACTIN® M2 (гомотетрамера стрептавидина, содержащего последовательность аминокислот мутеина, указанную в SEQ ID NO:6, см., например, Патент США No. 6103493 и Voss and Skerra (1997) Protein Eng., 1:975-982, и Argarana et al. (1986) Nucleic Acids Research, 1871-1882). Для подготовки мутеинов стрептавидина для олигомеризации, мутеины стрептавидина, содержащие одну или несколько реакционноспособных тиоловых групп, инкубировали с активированными малеинимидом мутеинами стрептавидина. Для получения тиолированного мутеина стрептавидина, приблизительно 100 мг мутеина стрептавидина тиолировали посредством инкубации с гидрохлоридом 2-иминотиолана в молярном соотношении 1:100 при pH приблизительно 8,5 при 24°C в течение 1 час в буфере 100 мМ борате в общем объеме 2,6 мл. Для реакции активации, приблизительно 400 мг мутеина стрептавидина инкубировали с сукцинимидил-6-[(β-малеимидопропионамидо)гексаноатом (SMPH) в молярном соотношении 1:2 при pH приблизительно 7,2 при 24°C в течение 1 час в общем объеме приблизительно 10,4 мл в буфере фосфате натрия. Реакции тиолирования и активации координировали для запуска приблизительно в одно и то же время, и длительность реакций контролировали

[0762] После реакций, гидрохлорид 2-иминотиолана и SMPH удаляли из образцов посредством индивидуального проведения гель-фильтрации образцов с использованием обессоливающих колонок PD-10 (GE Healthcare). Для каждого 2,5 мл объема образца, 1 мл колонку PD-10 уравнивали и наносили либо тиолированный мутеин стрептавидина, либо малеинимидный мутеин стрептавидина, и элюцию проводили посредством добавления 3,5 мл буфера для присоединения (100 мМ NaH₂P₄, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, pH 7,2). Гель-фильтрацию малеинимидного мутеина стрептавидина проводили на 4 колонках для достижения объема > 10 мл, и элюаты пулировали. Периоды времени реакций активации и тиолирования, и периоды времени между концом реакций активации и тиолирования, и началом реакций олигомеризации тщательно контролировали. Как правило, позволяли проходить не более десяти минут от начала гель-фильтраций, т.е.

конца реакций активации и тиолирования, до момента, когда инициировали реакцию олигомеризации.

[0763] Для олигомеризации, образцы малеинимидного мутеина стрептавидина и тиолированного мутеина стрептавидина затем объединяли в общем объеме приблизительно 17,5 мл и инкубировали в течение 1 час при pH 7,2 при 24°C в условиях перемешивания при приблизительно 600 об./мин. Поскольку в четыре раза больше мутеина стрептавидина инкубировали с SMPH, чем с гидрохлоридом 2-иминотиолана, молярное соотношение тиолированного мутеина стрептавидина и малеинимидного мутеина стрептавидина составляло 1:4 во время реакции олигомеризации. После реакции, оставшиеся группы SH олигомеризованного реагента мутеина стрептавидина насыщали посредством инкубации с N-этилмалеинимидом (NEM) в течение 15 мин при 24°C при перемешивании (приблизительно 600 об./мин), с последующей инкубацией в течение дополнительных 16-20 часов при 4°C.

[0764] После инкубации с NEM, образец, содержащий олигомеризованный мутеин стрептавидина, центрифугировали и супернатант фильтровали через 0,45 мкм мембрану (Millex-HP 0,45 мкм от Merck Millipore). Затем фильтрованный раствор наносили на колонку (Sephacryl S-300 HR HiPrep 26/60, GE Healthcare) для эксклюзионной хроматографии (SEC) с использованием хроматографической системы АКТА Explorer (GE Healthcare). Фракции с количеством миллиединиц оптической плотности (mAU), большим или равным 1500 mAU, пулировали.

[0765] Пулированный образец, содержащий олигомерный мутеин стрептавидина, обрабатывали с использованием 100 mM гидроксилamina при pH 6,35 в течение 15 минут при комнатной температуре. Для удаления гидроксилamina после обработки, образец наносили на колонку PD10 (2,5 мл на колонку) и элюировали с использованием 3,5 мл буфера, содержащего 100 mM NaH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,2. Элюаты PD10 пулировали и стерилизовали фильтрацией с использованием 0,45 мкм фильтра, затем 0,22 мкм фильтра, и затем образцы замораживали и хранили при -80°C. Перед замораживанием, конечную концентрацию олигомерного реагента мутеина стрептавидина измеряли, и размер олигомерного реагента мутеина стрептавидина определяли посредством динамического светорассеяния (DLS).

[0766] Для оценки единообразия процесса олигомеризации, 10 олигомерных реагентов мутеинов стрептавидина получали с использованием способов, описанных выше, из пяти различных лотов мутеина стрептавидина (SAM). Средний размер, процент выхода (определенный посредством измерения оптической плотности при 280 нм без коррекции на фон) и активность (связывание биотина) олигомеров оценивали, и результаты показаны в таблице E1. Результаты показали, что полученные олигомерные реагенты мутеины стрептавидина являлись согласованными по этим параметрам со средним радиусом $97 \text{ нм} \pm 10 \text{ нм}$ и связыванием биотина $40 \text{ нмоль/мг} \pm 3 \text{ нмоль/мг}$.

Таблица E1: Сравнение олигомеризованного STREP-TACTIN из различных партий.

	Лот SAM	Радиус (нм)	Выход (%)	Связывание биотина
--	---------	-------------	-----------	--------------------

				(нмоль/мг)
Партия 1	1	92	74	41
Партия 2	2	100	68	40
Партия 3	2	106	82	37
Партия 4	2	94	73	39
Партия 5	3	87	79	41
Партия 6	3	90	81	39
Партия 7	4	97	84	43
Партия 8	4	97	76	43
Партия 9	5	102	85	42
Партия 10	5	87	63	42

[0767] Среднюю молекулярную массу (MW) трех олигомерных реагентов мутеинов стрептавидина, полученных, как описано выше, измеряли посредством проточного фракционирования в поперечном поле (AF4), проведенного с использованием системы HPLC (AGILENT 1100 и Wyatt ECLIPSE DUALTEC) с УФ-детекцией (УФ-детектор Agilent в сочетании с MALLS DAWN HELEOS (Wyatt)). Измерения посредством AF4 позволяли расчет среднего количества тетрамеров мутеина стрептавидина в каждом олигомерном реагенте, принимая среднюю молекулярную массу тетрамера мутеина стрептавидина 52500 г/моль (52,5 кДа) (Таблица E2).

Таблица E2: Размер и молекулярная масса олигомерных реагентов мутеинов стрептавидина

Радиус (нм)	MW (г/моль)	Количество тетрамеров
102	$1,65 \times 10^8$	3150
82	$1,08 \times 10^8$	2050
92	$1,26 \times 10^8$	2280

[0768] Стимулирующие средства (фрагменты Fab против CD3 и против CD28) мультимеризовали посредством обратимого связывания с олигомерным реагентом мутеином стрептавидина, полученным, как описано выше. Фрагменты Fab против CD3 и против CD28 обратимо связывали с олигомером мутеина стрептавидина посредством партнера по связыванию пептида стрептавидина, слитого с каждым фрагментом Fab. Фрагмент Fab против CD3 получен из связывающего CD3 моноклонального антитела, продуцированного линией клеток гибридомы ОКТ3 (ATCC® CRL-8001™; см. также Патент США No. 4361549), и содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи антитела против CD3 ОКТ3, описанного в Arakawa et al J. Biochem. 120, 657-662 (1996). Эти последовательности указаны в SEQ ID NO: 31 и 32, соответственно. Фрагмент Fab против CD28 получен из антитела CD28.3 (депонированного как синтетическая конструкция одноцепочечного Fv под No. Доступа в GenBank AF451974.1; см. также Vanhove et al., BLOOD, 15 July 2003, Vol. 102, No. 2, pages 564-570) и содержит вариабельные домены тяжелой и легкой цепей антитела против CD28 CD28.3, указанные в SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно. Фрагменты Fab индивидуально сливали на карбокси-конце их тяжелой цепи со связывающей пептид стрептавидина

последовательностью, содержащей последовательную аранжировку двух связывающих стрептавидин модулей, имеющих последовательность аминокислот SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16). Меченные пептидом фрагменты Fab получены рекомбинантным способом (см. Публикации международных патентных заявок No. WO 2013/011011 и WO 2013/124474).

[0769] Для осуществления обратимого связывания, меченные пептидом фрагменты Fab против CD3 и против CD28 смешивали с олигомерным реагентом мутеином стрептавидина при приблизительно комнатной температуре, таким образом, обратимо связывая их с реагентом посредством взаимодействия между twin Strep-метками на фрагментах Fab, которые представляли собой партнеры по связыванию, способные обратимо связывать участки связывания на реагенте. В некоторых случаях, меченные пептидом фрагменты Fab предварительно смешивали до иммобилизации на олигомерном реагенте мутеине стрептавидина, что, в некоторых случаях, может приводить к более однородному распределению различных молекул Fab. Связывание меченных пептидом антител против CD3 и против CD28 с олигомерным реагентом мутеином стрептавидина можно нарушать или обращать, посредством добавления D-биотина. D-биотин конкурирует с strep-меткой на средствах за связывание с партнером по связыванию на мутеине стрептавидина, таким образом, нарушая связывание.

Пример 2: Оценка активности олигомеризованных фрагментов Fab против CD3 и против CD28, обратимо связанных с олигомерами мутеина стрептавидина.

[0770] Фрагменты Fab против CD3 и против CD28, обратимо связанные с различными олигомерными стрептавидиновыми реагентами из каждой из партий, описанных в таблице E1, способом, описанным в примере 1, оценивали по способности стимулировать Т-клетки. Эти олигомерные стрептавидиновые реагенты имели средний радиус приблизительно 95 нм. Метаболическую активность клеток в качестве показателя пролиферации клетки оценивали посредством колориметрического мониторинга расщепления стабильного комплекса соли тетразолия WST-1 с растворимым красителем формазаном.

[0771] Т-клетки, от трех различных доноров, инкубировали с мультимеризованными фрагментами Fab против CD3/против CD28, обратимо связанными на олигомерном стрептавидиновом реагенте. Клетки также инкубировали с контрольными олигомерными реагентами, которые имели средний радиус либо 101 (внутренний эталон), либо 36 нм, которые также были обратимо связаны с фрагментами Fab против CD3/против CD28.

[0772] После инкубации, реагент WST-1 добавляли к клеткам, и уровни метаболической активности оценивали посредством измерения оптической плотности при 450 нм в качестве считываемого показателя. Результаты нормализовали на количество клеток в анализируемой культуре и описывали как соотношение WST-1 на количество клеток.

[0773] Как показано на ФИГ. 2В, средняя активность WST-1 Т-клеток, стимулированных каждым из тестируемых реагентов, являлась сравнимой. Кроме того, степень стимуляции являлась сходной для всех тестируемых реагентов и являлась сравнимой с внутренним эталонным реагентом сходного размера (с изменчивостью, как правило, в пределах ± 2 стандартных отклонений). На ФИГ. 2А показана активность WST-1, изображенная как отдельная точка данных для каждого реагента. ФИГ. 2А и ФИГ. 2В показывают, что стимуляция Т-клеток, как наблюдали по активности WST-1, была более низкой с использованием Fab против CD3/против CD28, мультимеризованных на меньшем остове олигомерного реагента мутеина стрептавидина 36 нм.

Пример 3: Отбор и стимуляции Т-клеток посредством хроматографии на колонке.

[0774] Проводили исследование обогащения Т-клеток посредством аффинной хроматографии на основе колонки со стимуляцией на колонке в присутствии олигомерного стимулирующего средства против CD3/против CD28.

[0775] В этом исследовании, Sephadex G50 (Sigma) использован в качестве стационарной фазы и ковалентно связывали с STREP-TACTIN® M2 (SEQ ID NO: 6) с использованием активированной бромидом цианогена (CNBr) смолы. 50% суспензия Sephadex G50 содержала приблизительно 70 мкг ковалентно связанного 7 Strep-tactin®/мл суспензии бусин. После иммобилизации STREP-TACTIN® на стационарной фазе, два мл суспензии Sephadex G50 с Strep-tactin® инкубировали с 10 мкг средства для отбора, специфического для селективного маркера поверхности Т-клетки в течение 20 мин при 4°C, чтобы позволить связывание фрагмента Fab с иммобилизованным реагентом Strep-tactin®. Затем суспензией заполняли пластиковую миниколонку с 90 микрометровой фриттой на дне. Колонку уравнивали PBS (фосфатно-солевым буфером), содержащим 0,5% бычьего сывороточного альбумина (буфером PBSA), для получения объема слоя 1 мл.

[0776] В этих исследованиях, эксперименты проводили с использованием, в качестве средства для отбора, связывающего фрагмента Fab против CD3, связывающего фрагмента Fab против CD4 или связывающего фрагмента Fab против CD8, в качестве средства для отбора. Связывающий CD3 фрагмент Fab получен из связывающего CD3 моноклонального антитела, продуцированного линией клеток гибридомы ОКТ3 (ATCC® CRL-8001™; см. также Патент США No. 4361549), и содержит переменный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO:31) и переменный домен легкой цепи (SEQ ID NO:32) антитела против CD3 ОКТ3, описанного в Arakawa et al J. Biochem. 120, 657-662 (1996). Связывающий CD4 фрагмент Fab получен из m13B8.2 (например, Патент США 7482000) и содержит переменный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO:29) и переменный домен легкой цепи (SEQ ID NO:30) антитела против CD4 m13B8.2. Связывающий CD8 фрагмент Fab получен из ОКТ8 (например, ATCC CRL-8014) и содержит переменный домен тяжелой цепи (SEQ ID NO:9) и переменный домен легкой цепи (SEQ ID NO:10) антитела против CD8 ОКТ8. Тяжелая цепь каждого из фрагментов Fab слита на карбокси-конце с

Twin Strep-меткой® (SEQ ID NO:16), содержащей последовательную аранжировку двух связывающих стрептавидин модулей.

[0777] Образец после афереза от донора-человека наносили на аффинную колонку, и две стадии промывки осуществляли после того, как более чем 30 минут проходило от времени нанесения образца, 40 мкг мультимеризованных фрагментов Fab против CD3/против CD28, обратимо связанных с олигомерным реагентом мутеином стрептавидина (олигомерным реагентом против CD3/против CD28), полученным, как описано в примере 1, наносили на колонку в 3 мл бессывороточной базовой среды, содержащей глутамин и рекомбинантные IL-2, IL-15 и IL-7, и инкубировали при 37°C. После приблизительно 24 часов, клетки собирали из колонки за одну стадию посредством пропускания приблизительно 80 мл бессывороточной базовой среды, содержащей глутамин и рекомбинантные IL-2, IL-15 и IL-7, без добавления дополнительного конкурентного вещества для нарушения связывания, через колонку. В качестве контроля, образец после афереза наносили на аффинную колонку против CD3, но без инкубации в присутствии олигомерного стимулирующего реагента против CD3/против CD28. Для контрольных условий, через 24 часа D-биотин добавляли для нарушения связывания между Twin Strep-меткой® из Fab против CD3 и STREP-TACTIN®, и высвобожденные клетки собирали под действием силы тяжести.

[0778] Приблизительно через 24 часа после начала стимуляции с олигомерным реагентом против CD3/против CD28, собранные клетки анализировали по поверхностной экспрессии селективного маркера. Как показано на ФИГ. 3, понижающую регуляцию CD3, CD4 и CD8 наблюдали через 24 часа после отбора на колонке с использованием соответствующего средства для отбора, специфического для селективного маркера, и инкубации со стимулирующим реагентом. В отличие от этого, для контрольных условий, в которых клетки не инкубировали с олигомерным стимулирующим реагентом, понижающую регуляцию рецептора - селективного маркера не наблюдали. Эти результаты согласуются с наблюдением, что стимуляция Т-клеток с использованием стимулирующего реагента против CD3/против CD8 приводила к понижающей регуляции поверхностной экспрессии рецептора, таким образом, позволяя спонтанное открепление клеток из колонки без необходимости добавления конкурентного реагента.

[0779] Проводили сходное исследование, в котором Т-клетки отбирали на аффинной колонке против CD3 с STREP-TACTIN® и подвергали стимуляции на колонке с использованием олигомерного стимулирующего реагента против CD3/против CD28, как описано выше. Клетки собирали под действием силы тяжести в различные моменты времени после добавления олигомерного стимулирующего реагента. Собранные клетки немедленно окрашивали с использованием антитела против цепей альфа-бета TCR и мониторируют посредством проточной цитометрии для детекции поверхностной экспрессии CD3. ФИГ. 4 иллюстрирует иллюстративную кинетику понижающей регуляции комплекса CD3/TCR и повторной экспрессии после начала стимуляции в присутствии олигомерного стимулирующего реагента против CD3/против CD28. Как

показано, быструю понижающую регуляцию поверхностной экспрессии комплекса CD3/TCR наблюдали во время первых 24 часов стимуляции, с максимальным уменьшением поверхностной экспрессии комплекса CD3/TCR, наблюдаемой через только 12 часов. Инкубация в присутствии олигомерного стимулирующего реагента в течение дольше, чем 36 часов, приводила к повторной экспрессии поверхностного комплекса CD3/TCR с максимальной повторной поверхностной экспрессией комплекса CD3/TCR, достигаемой в пределах приблизительно 72 часов после начала стимуляции со стимулирующим реагентом. Эти результаты поддерживают, что опосредованное последующей стимуляцией на колонке спонтанное открепление Т-клеток может происходить в пределах 4-6 часов, где максимальное высвобождение происходит через или приблизительно через 12 часов, после начала инкубации на колонке со стимулирующим реагентом.

[0780] Клетки, которые спонтанно откреплялись приблизительно через 24 часа после добавления олигомерного стимулирующего реагента против CD3/против CD28, культивировали при 37° С в бессывороточной базовой среде, содержащей глутамин и рекомбинантный IL-2, IL-15 и IL-7, в течение вплоть до 9 суток. Во время инкубации, олигомерный стимулирующий реагент не удаляли; однако, он подвергался разведению, поскольку клетки продолжали размножаться во время инкубации. Клетки мониторируют, через 24 часа и через 5 суток во время последующей инкубации, по размеру и экспрессии CD3, и маркеров активации CD69 и CD25. Как показано на ФИГ. 5А, дальнейшая инкубация в течение вплоть до 5 суток приводила к повторной экспрессии CD3, после того как раннюю понижающую регуляцию CD3 наблюдали через 24 часа. Кроме того, увеличение размера клеток и поверхностной экспрессии маркеров активации CD25 и CD69 также наблюдали через 5 суток по сравнению с временной точкой 24 часа. Оценка количества клеток и кратности размножения после последующей инкубации в течение вплоть до 9 суток показала, что спонтанно открепившиеся клетки имели высокую пролиферативную способность (ФИГ. 5В). Эти результаты согласовываются с наблюдением, что Т-клетки, подвергнутые отбору на колонке и кратковременной стимуляции, являются способными подвергаться дополнительной инкубации для достижения желательной стимуляции, активации и/или размножения.

[0781] Эти результаты поддерживают использование отбора и стимуляции на колонке в качестве быстрых способов (например, менее чем за 24 часа) выделения и стимуляции клеток-мишеней до, или в связи с нижестоящими процессами (например, трансдукцией) для получения композиция модифицированных Т-клеток.

Пример 4: Оценка фенотипа и функции Т-клеток в модифицированных Т-клетках, полученных в присутствии низкомолекулярного ингибитора киназы mTOR

[0782] CD4+ и CD8+ Т-клетки выделяли посредством обогащения на основе иммуноаффинности из образцов после лейкофереза от субъектов - доноров-людей. На сутки 1, выделенные CD4+ и CD8+ Т-клетки смешивали 1:1 и стимулировали с использованием олигомерного стимулирующего реагента против CD3/против CD28,

полученного, как описано в примере 1, в бессывороточных средах, дополненных рекомбинантным IL-2 (100 МЕ/мл), рекомбинантным IL-7 (600 МЕ/мл) и рекомбинантным IL-15 (100 МЕ/мл) в присутствии или в отсутствие 1 мкМ 2-(3-гидроксифенил)-9-(2-изопропилфенил)-8-оксо-8,9-дигидро-7Н-пурин-6-карбоксамид (соединения 63). Т-клетки, культивированные в присутствии или в отсутствие соединения 63, инкубировали в течение ночи (приблизительно 24 час) при 37°C и затем трансдуцировали в бессывороточных культуральных средах, в присутствии или в отсутствие соединения 63 (1 мМ), с использованием лентивирусного вектора, кодирующего CAR против CD19. CAR содержал антигенсвязывающий домен scFv, специфический для CD19 (происходящий из FMC63), CD28, трансмембранную область передающей костимулирующие сигналы области 4-1BB и происходящий из CD3-дзета внутриклеточный передающий сигналы домен. После трансдукции, клетки инкубировали в бессывороточных средах без рекомбинантных цитокинов (базовая среда) и в присутствии или в отсутствие соединения 63 (1 мМ), и обеспечивали инкубацию при приблизительно 37,0°C в инкубаторе в течение вплоть до 96 часов после начала стимуляции с олигомерным стимулирующим реагентом против CD3/против CD28 (до суток 5 процесса). Через приблизительно 24 часа после начала инкубации (сутки 3 процесса), добавляли 1 мМ биотин. После инкубации CD4+ и CD8+ Т-клетки от каждого донора собирали, составляли и криозамораживали.

[0783] Криозамороженные модифицированные CD4+ и CD8+ Т-клетки размораживали, и Т-клетки оценивали по фосфорилированию внутриклеточного S6, рибосомного белка и маркера ингибирования mTOR, и совместно окрашивали по поверхностной экспрессии CD4 или CD8, и по CCR7 и CD45RA в качестве маркеров подгрупп клеток памяти. Экспрессию pS6 в живых CD8+ Т-клетках по подгруппам клеток памяти показывали по экспрессии CCR7 и CD45RA Как показано на ФИГ. 6А, инкубация с соединением 63 уменьшала среднюю интенсивность флуоресценции стимулированных подгрупп Т-клеток памяти, клеток Temra, Tem и Tcm, что показывает ингибирование mTOR, в то же время без наличия значительного эффекта на процент или общее количество жизнеспособных клеток с течением времени. средняя интенсивность флуоресценции (MFI) PS6 в CD8+ Тк клетках показана на ФИГ. 6В. Как показано на ФИГ. 6С и ФИГ. 6D, присутствие соединения 63 не влияло на процент жизнеспособных клеток/или общее количество живых клеток, соответственно, в полученной композиции.

[0784] Размороженные клетки, полученные описанным способом, оценивали по маркеру апоптоза (например, проценту положительных по каспазе CAR-Т-клеток), фенотипическому профилю и способности продуцировать внутриклеточные цитокины после стимуляции PMA/иономицином и ингибитором Гольджи. Как показано на ФИГ. 7А, для Т-клеток из образцов, инкубированных с соединением 63, показана меньшая внутриклеточная экспрессия каспазы, чем для не инкубированных с соединением 63, что показывает, что присутствие соединения 63 в ходе способа получения модифицированных клеток улучшало общее состояние клеток из композиции Т-клеток. Размороженные клетки также окрашивали по поверхностной экспрессии CD27 и CCR7 посредством

проточной цитометрии. Как показано на ФИГ. 7B (CD8+ Т-клетки) и ФИГ.7D (CD4+ Т-клетки), инкубация с соединением 63 по существу не изменяла фенотипический профиль подгрупп клеток, как оценено по экспрессии CD27 и/или CCR7. Функциональная активность CD4+ и CD8+ Т-клеток, полученных в присутствии соединения 63, как доказано по уровню внутриклеточных цитокинов IL2, IFN γ или TNF, являлась существенно улучшенной для модифицированных CD8+ Т-клеток (ФИГ. 7C) и CD4+ Т-клеток (ФИГ. 7E), полученных в присутствии соединения 63.

Для дополнительной оценки функциональной активности клеток, полученные композиции Т-клеток длительно стимулировали более 12 суток с использованием бусин, конъюгированных с антиидиотипическим (ID) антителом против CAR против CD19, и мониторируют размножение и выживаемость клеток (ФИГ. 7F, левая панель) и суммарный показатель размножения, рассчитанный по площади под кривой (ФИГ. 7F, правая панель). Как показано, стимуляция клеток в отсутствие соединения 63 приводила к уменьшению размножения клеток с течением времени с хронической стимуляцией CAR и потерей устойчивого функционирования после длительной стимуляции. Результаты показывают, что улучшенное функционирование Т-клеток наблюдали после длительной специфической для CAR стимуляции для модифицированных клеток, полученных в присутствии соединения 63.

Пример 5: Оценка фенотипических и функциональных свойств Т-клеток, модифицированных с использованием объединенного способа отбора и стимуляции на колонке.

[0785] Способ, объединяющий стадии отбора и стимуляции на хроматографической колонке (отбора и стимуляции на колонке) осуществляли по существу, как описано в примере 3, но в крупном масштабе. Способ отбора и стимуляции на колонке сравнивали с альтернативным способом, который являлся по существу сходным, но в которых стадию стимуляции проводили отдельно от отборе и в растворе.

А. Отбор и стимуляция на колонке

[0786] На сутки 0, образец после афереза от донора-человека наносили на аффинную колонку, содержащую стационарную фазу Sephadex G50 (Sigma), ковалентно связанную с StrepTactin® (SEQ ID NO: 6) с использованием смолы, активированной цианогенбромидом (CNBr). 20 мл стационарной фазы являлись способными накапливать вплоть до 2 миллиардов \pm 0,5 миллиардов клеток. Средство для отбора, связывающий фрагмент Fab против CD3, как описано в примере 3, было иммобилизовано на стационарной фазе посредством слитого по карбокси-концу тяжелой цепи связывающего стрептавидина пептида (Twin Strep-метки®; SEQ ID NO:16), способного связывать StrepTactin.

[0787] Через приблизительно 60 минут от времени загрузки образца, мультимеризованные фрагменты Fab против CD3/против CD28, обратимо связанные с олигомерным реагентом мутеином стрептавидина (олигомерный реагент против CD3/против CD28), полученные, как описано в примере 1, наносили на колонку в

фиксированной дозе 0,2-0,3х (1-2 мкг/1 миллион клеток) в бессывороточной среде, содержащей рекомбинантный IL-2 (например, 100 МЕ/мл), IL-15 (например, 100 МЕ/мл) и IL-7 (например, 600 МЕ/мл), и инкубировали при 37°C на колонке в течение приблизительно 4,5 часов. Во время инкубации, стимуляция олигомерным реагентом против CD3/против CD28 приводила к откреплению или высвобождению иммобилизованных клеток от средства для отбора на колонке. Высвобожденные клетки элюировали из колонки под действием силы тяжести с использованием такой же бессывороточной среды. Среда не включала биотин или любое конкурентное вещество для нарушения связывания между StrepTactin® на стационарной фазе и связывающим стрептавидин пептидом, слитым с антителом против CD3, используемым для иммобилизации клеток на стационарной фазе колонки.

[0788] Высвобожденные и собранные клетки затем трансдуцировали для экспрессии химерного рецептора антигена (CAR) посредством инкубации в течение 1 час в такой же бессывороточной среде с лентивирусным вектором, кодирующим иллюстративный CAR против CD19. Иллюстративный CAR содержал scFv против CD19, происходящий из мышинового антитела FMC63, иммуноглобулиновый спейсер, трансмембранный домен, происходящий из CD28, костимулирующую область, происходящую из 4-1BB, и внутриклеточный передающий сигналы домен CD3-дзета. Для трансдукции, объем культуры довели до 1×10^6 клеток/мл.

[0789] Трансдуцированные клетки промывали и затем дополнительно инкубировали при 37°C. Приблизительно через 48 часов после начала стимуляции на колонке с использованием олигомерного реагента против CD3/против CD28, 1,0 мМ D-биотин добавляли и смешивали с клетками для диссоциации Fab против CD3 и против CD28 от растворимого олигомерного реагента мутеина стрептавидаина.

[0790] После добавления биотина, клетки дополнительно инкубировали при 37°C в течение дополнительных приблизительно 24 часов. Затем клетки разделяли на две подгруппы. В первой подгруппе, клетки непосредственно составляли с криопротектором. Во второй подгруппе, объем клеток довели до $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в бессывороточной среде, содержащей двукратную концентрацию IL-2, IL-7 и IL-15, по отношению к используемой во время стадий инкубации и трансдукции. Клетки из этой второй подгруппы дополнительно инкубировали для размножения посредством культивирования в течение следующих 5 суток при 37°C в статической культуре с заменой среды, и затем составляли с криопротектором.

В. Альтернативный способ: отдельные отбор и стимуляция (в растворе)

[0791] Альтернативный способ осуществляли в общем, как описано выше, но стадии для отбора и стимуляции не объединяли на колонке. Образец после афереза от того же самого донора-человека наносили на аффинную колонку, содержащую реагент для отбора против CD3, как описано выше, для отбора CD3+ Т-клеток. Для элюции отобранных клеток, 1,0 мМ D-биотин добавляли в колонку, и элюированные клетки собирали. D-биотин действовал в качестве конкурентного вещества для нарушения

связывания между связывающим стрептавидин пептидом, слитым с Fab против CD3, и StrepTactin® на стационарной фазе, для высвобождения клеток из колонки и Fab против CD3.

[0792] На сутки 0 альтернативного способа, отобранные клетки промывали, разводили до 1×10^6 /мл, и стимулировали посредством инкубации с конъюгированными с Fab против CD3/против CD28 олигомерными реагентами мутеинами стрептавидина, полученными, как описано в примере 1, в фиксированной дозе (0,3х, приблизительно 2 мкг/1 миллион клеток). Стимуляцию проводили в течение между приблизительно 18-30 часов (24±6 часов) в бессывороточных средах, содержащих рекомбинантный IL-2 (например, 100 МЕ/мл), рекомбинантный IL-7 (например, 600 МЕ/мл) и рекомбинантный IL-15 (например, 100 МЕ/мл).

[0793] После стимуляции, клетки трансдуцировали посредством спинокуляции в течение 30 минут в такой же бессывороточной среде с лентивирусным вектором, кодирующим такой же иллюстративный CAR против CD19, как описано выше.

[0794] После спинокуляции, клетки промывали и затем дополнительно инкубировали при 37 °С. Приблизительно через 48±6 часов после начала стимуляции с олигомерным реагентом против CD3/против CD28, 1,0 mM D-биотин добавляли и смешивали с клетками для диссоциации Fab против CD3 и против CD28 от олигомерного стрептавидинового реагента.

[0795] После добавления биотина, клетки дополнительно инкубировали при 37°С в течение дополнительных приблизительно 24 часов. Затем клетки разделяли на две подгруппы, сходные с вышеуказанными. В первой подгруппе, клетки непосредственно составляли с криопротектором. Во второй подгруппе, клетки дополнительно инкубировали для размножения посредством культивирования в течение следующих 5 суток при 37°С в статической культуре с заменой среды, и затем составляли с криопротектором.

С. Оценка восстановления и фенотипа клеток

[0796] Выход CD3+, CD4+ и CD8+ Т-клеток, высвобожденных из колонки, после отбора на колонке и стимуляции, сравнивали с клетками, высвобожденными из колонки в альтернативном способе, в котором только отбор проводили на колонке с добавлением биотина для высвобождения клеток. Как показано на ФИГ. 8А, выход CD3+ Т-клеток, так же как выход CD4+ и CD8+ Т-клеток, являлся сходным в обоих способах. Общее количество клеток и процент живых клеток после стимуляции среди клеток, высвобожденных из колонки после отбора и стимуляции на колонке, сравнивали с клетками после отдельной стимуляции отобранных клеток в альтернативном способе. На ФИГ. 8В и 8С показано общее количество клеток и процент живых клеток, соответственно, после стимуляции для обоих способов. В этом эксперименте, выделение клеток было больше для способа с использованием стимуляции на колонке.

[0797] Для способов, включающих дополнительные 5 суток культивирования, качество и фенотип популяций клеток, модифицированных посредством каждого способа,

оценивали на сутки 5 в культуре (сутки 8 от начала способа). На ФИГ. 9А и 9В показан процент выделенных живых Т-клеток и процент живых клеток, экспрессирующих иллюстративный CAR (CAR+), соответственно, для каждого способа. Образцы из композиций, полученных для обоих способов после дополнительного культивирования в течение 5 суток (сутки 8 от начала способа), оценивали посредством проточной цитометрии по поверхностной экспрессии маркеров, включающих CD4, CD8, CD27 и CCR7. На ФИГ. 9С представлено сравнение процента CD4+ Т-клеток, полученных на стадии отбора (альтернативный способ) или объединенной стадии отбора и стимуляции (стимуляции на колонке), с процентом живых CD4+ Т-клеток, присутствующих в композициях клеток в последние сутки культивирования после дополнительного культивирования (сутки 5).

[0798] На ФИГ. 9D показано, что процент CD27-CCR7-, CD27+CCR7-, CD27+CCR7+ и CD27-CCR7+ Т-клеток в композициях, полученных способом стимуляции на колонке, являлся сходным с процентами, присутствующими в композиции клеток, полученной альтернативным способом.

D. Оценка функции модифицированных Т-клеток после промышленного получения с использованием стимуляции на колонке

[0799] Функциональные способности модифицированных Т-клеток после промышленного получения с использованием способа, включающего стимуляцию на колонке, оценивали *in vitro* и *in vivo*. Результаты сравнивали с модифицированными Т-клетками после промышленного получения с использованием альтернативного способа.

1. Функциональный анализ in vitro

[0800] Цитолитическую активность оценивали посредством совместного культивирования модифицированных с использованием CAR против CD19 Т-клеток с клетками НЕК, экспрессирующими CD19 (НЕК CD19) в соотношении эффектора к мишени 5:1. Лизис клеток определяли посредством измерения сопротивления, проводимого в множестве временных точек во время культивирования. Контрольные условия включали инкубацию Т-клеток, экспрессирующих альтернативный CAR, нацеленный против отличной мишени (BCMA) (НЕК CD19+ BCMA CAR), только клеток-мишеней (только НЕК CD19+), или нецелевых клеток, инкубированных с Т-клетками с CAR против CD19 (НЕК CD19- и CD19 CAR). Как показано на ФИГ. 10, цитолитическая активность являлась специфической для клеток-мишеней, и для CAR-Т-клеток после промышленного получения посредством способа стимуляции на колонке показана сильная цитолитическая активность, которая являлась сходной с клетками, модифицированными посредством альтернативного способа. Эти данные показывают, что модифицированные Т-клетки после промышленного получения с использованием стимуляции на колонке, имеют сравнимую активность с модифицированными Т-клетками после промышленного получения с использованием альтернативного способа.

[0801] Активность цитокинов модифицированных Т-клеток оценивали посредством мониторинга накопления цитокинов после антигенспецифической

стимуляции с использованием линии клеток-мишеней (CD19+ НЕК клеток) в присутствии ингибитора Гольджи. Продукцию цитокинов оценивали посредством проточной цитометрии после внутриклеточного окрашивания цитокинов по IFN γ , IL-2 и TNF-альфа в клетках, которые также совместно окрашивали по поверхностному CD4, CD8 или CAR против CD19. На ФИГ. 11A-11C показаны проценты CD4+ и CD8+ подгрупп Т-клеток, полученных в каждом производственном процессе, которые экспрессировали IFN γ , IL-2 и TNF-альфа, соответственно. Т-клетки после промышленного получения, в соответствии с двумя способами, но лишенные экспрессии CAR, использовали в качестве контроля. Эти данные показывают, что антигенспецифическая продукция цитокинов CAR-Т-клетками является сравнимой для полученных клеток между производственными процессами.

2. Функциональный анализ *in vivo*

[0802] Противоопухолевую активность композиций Т-клеток, содержащих Т-клетки с CAR против CD19, полученные способом модификации со стимуляцией на колонке и альтернативным способом модификации, сравнивали *in vivo*.

[0803] Мышам NSG с иммунной недостаточностью инъецировали (*i.v.*) 5×10^5 клеток линии В-клеточной лимфомы (Raji) на сутки 0. На сутки 7, мышам инъецировали $0,75 \times 10^6$ CAR+ Т-клеток из CAR+ модифицированных композиций, полученных либо способом стимуляции на колонке, либо альтернативным способом. Три цикла промышленного получения завершали для каждого способа для трех различных доноров, и тестировали каждую полученную терапевтическую композицию модифицированных CAR+ Т-клеток. На ФИГ. 12A-12C показано соотношение CD4:CD8, эффективность трансдукции и процент жизнеспособных клеток, соответственно, для каждой модифицированной терапевтической композиции до инъекции. Как показано, для клеток из обоих способов получены сравнимые модифицированные клетки для каждого донора, хотя наблюдали некоторую изменчивость для доноров.

[0804] Опухолевую нагрузку измеряли *in vivo* посредством прижизненной люминесцентной визуализации в различных временных точках, вплоть до 41 суток после введения CAR-Т-клеток. Через шесть суток после инъекции опухоли, для животных во всех группах обработки показана сходная опухолевая нагрузка (ФИГ. 13). Как показано на ФИГ. 14, опухолевая нагрузка значительно уменьшалась с течением времени среди всех групп обработки. Эти результаты показывают сравнимую противоопухолевую эффективность между модифицированными терапевтическими CAR+ Т-клетками, полученными посредством производственных процессов.

Е. Заключение

[0805] Совместно, эти данные показывают, что отбор и стимуляцию на колонке можно использовать в способе получения модифицированных Т-клеток (например, CAR+ Т-клеток), включая способ, в котором отобранные Т-клетки собирают из колонки в пределах 4,5 часов после начала стимуляции с использованием олигомерного реагента против CD3/против CD28, для использования в последующих стадиях способа, включая трансдукцию. Результаты показывают, что способ отбора и стимуляции на колонке

приводит к получению композиции модифицированных (например, CAR+ клеток) клеток, имеющих фенотипические и функциональные признаки, которые являются сравнимыми с альтернативным способом, и еще его можно осуществлять более эффективно и за более короткое время, благодаря возможности объединения отбора и стимуляции в одну стадию.

[0806] Настоящее изобретение не ограничено по объему конкретными описанными вариантами осуществления, которые представлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов очевидны из описания и объяснений в настоящем описании. Такие варианты могут быть осуществлены на практике без отклонения от объема и содержания описания, и включены в объем настоящего описания.

[0807]

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№.	Последовательность	Описание
1	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIV TAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYD SAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSAT TWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAW KSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKKAGVNN GNPLDAVQQ	Стрептавидин Вид: Streptomyces avidinii UniProt No. P22629
2	MetGluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGly SerThrPheIleValThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThr GlyThrTyrGluSerAlaValGlyAsnAlaGluSerArgTyr ValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGl ySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnA snTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnT yrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuL euThrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrL euValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAla AlaSer	Минимальный стрептавидин Вид: Streptomyces avidinii
3	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIV TAGADGALTGTYYVTARGNAESRYVLTGRYD SAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSAT TWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAW KSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKKAGVNN GNPLDAVQQ	Мутеин стрептавидина Val44- Thr45-Ala46-Arg47 Вид: Streptomyces avidinii
4	MetGluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGly SerThrPheIleValThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThr GlyThrTyrValThrAlaArgGlyAsnAlaGluSerArgTy rValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGl ySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnA snTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnT yrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuL euThrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrL euValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAla AlaSer	Мутеин стрептавидина Val44- Thr45-Ala46-Arg47 Вид: Streptomyces avidinii
5	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIV TAGADGALTGTYYIGARGNAESRYVLTGRYD SAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSAT	Мутеин стрептавидина Ile44- Gly45-Ala-46-Arg47 Вид: Streptomyces avidinii

	TWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAW KSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKKAGVNN GNPLDAVQQ	
6	MetGluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGly SerThrPheIleValThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThr GlyThrTyrIleGlyAlaArgGlyAsnAlaGluSerArgTyr ValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGl ySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnA snTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnT yrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuL euThrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrL euValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAla AlaSer	Мутеин стрептавидина Ile44- Gly45-Ala-46-Arg47 Вид: Streptomyces avidinii
7	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	Связывающий стрептавидин пептид, Strep-метка®
8	WSHPQFEK	Strep-метка® II
9	His-Pro-Xaa	Связывающий стрептавидин пептид Xaa выбран из Gln, Asp, и Met
10	His-Pro-Gln-Phe	Связывающий стрептавидин пептид
11	Xaa ₁ -Xaa ₂ -His-Pro-Gln-Phe-Xaa ₃ -Xaa ₄	Связывающий стрептавидин пептид Xaa ₁ представляет собой Trp, Lys или Arg; Xaa ₂ представляет собой любую аминокислоту; Xaa ₃ представляет собой Gly или Glu Xaa ₄ представляет собой Gly, Lys или Arg
12	-Trp-Xaa ₁ -His-Pro-Gln-Phe-Xaa ₂ -Xaa ₃ -	Связывающий стрептавидин пептид Xaa ₁ представляет собой любую аминокислоту; Xaa ₂ представляет собой Gly или Glu Xaa ₃ представляет собой Gly, Lys или Arg
13	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa) _n -Trp- Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	Последовательные модули связывающего стрептавидин пептида Xaa представляет собой любую аминокислоту; n представляет собой 8 или 12
14	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys- (GlyGlyGlySer) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu- Lys	Последовательные модули связывающего стрептавидин пептида n представляет собой 2 или 3
15	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-метка
16	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-метка

17	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPOFEK	Twin-Strep-метка
18	WSHPQFEKGGGSGGGSWSHPOFEK	Twin-Strep-метка
19	WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-метка
20	Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala	HA-метка
21	Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys	VSV-G-метка
22	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	HSV-метка
23	Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly	эпитоп Т7
24	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	эпитоп HSV
25	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	эпитоп Мус
26	Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr	V5-метка
27	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTIV TARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSALTG WTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEA RINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKV KPSAAS	Мутеин стрептавидина Val44- Thr45-Ala46-Arg47 и Glu117, Gly120, Tyr121 (мутеин m1-9) Вид: Streptomyces avidinii
28	DPSKDSKAQVSAEAGITGTWYNQLGSTFIV TAGADGALTGTIVTARGNAESRYVLTGRYD SAPATDGSALTGWTVAWKNNYRNAHSAT TWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAG YSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин стрептавидина Val44- Thr45-Ala46-Arg47 и Glu117, Gly120, Tyr121 (мутеин m1-9) Вид: Streptomyces avidinii
29	AMQVQLKQSG PGLVQPSQSL SITCTVSGFS LTTFGVHWVR QSPGKGLEWL GVIWASGITD YNVPFMSRLS ITKDNSKSQV FFKLNSLQPD DTAIYYCAKN DPGTGFA YWG QGTLVTVSAG STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCGSAWSHPQ FEKGGGSGGG SGGSAWSHPQ FEK	Вариабельная тяжелая цепь фрагмента Fab m13B8.2
30	AMDIQMTQSP ASLSASVGET VTFTCRASEM IYSYLAWYQQ KQGKSPQLLV HDAKTLAEGV PSRFSGGGSG TQFSLKINTL QPEDFGTYIC QAHYGNPPTF GGGTKLEIKR GIAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADYЕК HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGECGS	Вариабельная легкая цепь фрагмента Fab m13B8.2
31	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser	Вариабельная тяжелая цепь антитела против CD3 OKT3

	Ser	
32	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn	Вариабельная легкая цепь антитела против CD3 OKT3
33	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val	Вариабельная тяжелая цепь антитела против CD28 CD28.3
34	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	Вариабельная легкая цепь антитела против CD28 CD28.3
35	His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys	МАТ-метка
36	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala1 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr65 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	Вариабельная тяжелая цепь huOKT8
37	Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	Вариабельная легкая цепь huOKT8
38	-PGGG-(SGGGG) ₅ -P-	Линкер P представляет собой пролин,

		G представляет собой глицин, и S представляет собой серин
39	GSADDAKKDAAKKDGKS	Линкер
40	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	альфа-цепь GMCSFR (аминокислоты)
41	atgcttctctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagc attctctctgatccca	альфа-цепь GMCSFR (нуклеиновая кислота)
42	MALPVTALLPLALLHA	сигнальный пептид CD8-альфа
43	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGE FKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFR GDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQA WPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAV VSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYAN TINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRE CVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQA MNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPA GVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTY GCTGPGLEGCPNTPGPKIPSIATGMVGALLLLL VVALGIGLFM	укороченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR)
44	RKVCNGIGIGIEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSIS GDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTV KEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRT KQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVII SGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCV SCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYID GPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHV CHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPGPKIPSIAT GMVGALLLLLVALGIGLFM	укороченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR)
45	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
46	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
47	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
48	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
49	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
50	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
51	DYGVVS	CDR H1
52	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
53	YAMDYWG	CDR H3
54	HYYYGGSYAMDY	CDR H3
55	RASQDISKYLN	CDR L1
56	SRLHSGV	CDR L2
57	HTSRLHS	CDR L2
58	GNTLPYTFG	CDR L3
59	QQGNTLPYT	CDR L3
60	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNS	VH

	ALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	
61	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKY LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGTKLEIT	VL
62	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер
63	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcggcagcctgg ggaccgggtgacctcagctgccgggcccagccaggacatcagca agtacctgaactggatcagcagaagccccgacggcaccgtcaagctg ctgatcaccacaccagccggctgcacagcggcgtgccagccgggtt tagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgacctctccaacc tgaacaggaagatcggcacctactttgccagcagggcaacaca ctgccctacacctttggcggcgaacaaagctggaatcaccggcag cacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcagcaccaa ggcgagggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggcccc cagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctg cccgactacggcgtgagctggatccggcagccccccaggaagggc ctggaatggctgggcgtgatctggggcagcagaccactactaaa cagcgcctgaagagccggctgacctatcaaggacaacagcaag agccaggtgtcctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccg ccatctactactgcccaagcactactactacggcggcagctacgcca tggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcagc	Последовательность, кодирующая scFv
64	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKY LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEV KLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALK SRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA KHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	scFv
65	SYWMN	CDR H1
66	QIYPGDGDТNYNGKFKG	CDR H2
67	KTISSVDFYFDY	CDR H3
68	QQYNRYPYT	CDR L3
69	SYWMN	CDR H1
70	QIYPGDGDТNYNGKFKG	CDR H2
71	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSS YWMNWKQRPQGLEWIGQIYPGDGDТNY NGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDS AVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTТVTVSS	VH
72	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGT NVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDFR TGSGSGTDFLTITNVQSKDLADYFCQQYNR YPYTSGGGTKLEIKR	VL
73	KASQNVGTNVA	CDR L1
74	SATYRNS	CDR L2
75	QQYNRYPYT	CDR L3
76	SYWMN	CDR H1
77	QIYPGDGDТNYNGKFKG	CDR H2
78	KTISSVDFYFDY	CDR H3
79	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер

80	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSS YWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNY NGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDS AVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSS GGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVG DRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKP LIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFLTITNV QSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGGTKLEIKR	scFv
81	ESKYGPPCPPCP	спейсер (шарнир IgG4) (ак) Homo sapiens
82	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCT TGCCCT	спейсер (шарнир IgG4) (н.) homo sapiens
83	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Спейсер шарнир-CH3 Homo sapiens
84	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLGLGK	Спейсер шарнир-CH2-CH3 Homo sapiens
85	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAP ATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPE CPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCF VVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLE RHSNGSQSHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLN HPSLPPQRLMALREPAQAQAPVKLSLNLLASS DPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQRE VNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAP PSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIV TDH	IgD-шарнир-Fc Homo sapiens
86	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG
87	X1PPX2P X1 представляет собой глицин, цистеин или аргинин X2 представляет собой цистеин или треонин	Иллюстративный шарнир IgG
88	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG
89	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG
90	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPE PKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	Иллюстративный шарнир IgG
91	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG
92	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG
93	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG
94	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративный шарнир IgG

95	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 153-179 из No. доступа P10747) Homo sapien
96	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPL FPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF WV	CD28 (аминокислоты 114-179 из No. доступа P10747) Homo sapiens
97	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY APPRDFAAYRS	CD28 (аминокислоты 180-220 из P10747) Homo sapiens
98	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY APPRDFAAYRS	CD28 (LL до GG) Homo sapiens
99	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCEL	4-1BB (аминокислоты 214-255 из Q07011.1) Homo sapiens
100	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CD3-дзета Homo sapiens
101	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLY QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CD3-дзета Homo sapiens
102	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CD3-дзета Homo sapiens
103	GluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySer ThrPhelleValThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGly ThrTyrGluSerAlaValGlyAsnAlaGluSerArgTyrVal LeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGlySe rGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnT yrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrV alGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuT hrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrLeuV alGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAlaAlaS er	Минимальный стрептавидин Вид: Streptomyces avidinii
104	GluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySer ThrPhelleValThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGly ThrTyrValThrAlaArgGlyAsnAlaGluSerArgTyrVa lLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGlySe rGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnT yrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrV alGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuT hrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrLeuV alGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAlaAlaS er	Мутеин стрептавидина Val44- Thr45-Ala46-Arg47 Вид: Streptomyces avidinii
105	GluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySer ThrPhelleValThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGly ThrTyrIleGlyAlaArgGlyAsnAlaGluSerArgTyrVal	Мутеин стрептавидина Ile44- Gly45-Ala46-Arg47 Вид: Streptomyces avidinii

	LeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGlySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAlaAlaSer	
106	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTVRKCCEPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc IgG2 человека (Uniprot P01859)
107	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSFLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	Fc IgG4 человека (Uniprot P01861)
108	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKMDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPHATLVFDVELLKE	FKBP
109	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPHATLVFDVELLKE	FKBP12v36
110	MGSNKSKPKDASQRRR	Модифицированный мотив ацилирования
111	Met-Gly-Cys-Xaa-Cys	двойной мотив ацилирования
112	Cys-Ala-Ala-Xaa	область ацилирования
113	EVQLVQSGAEMKKPGASLKLCKASGYTFIDYYVYWMRQAPGQGLESMGWINPNSGGTNYA QKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAMYYCARSQRDGYMDYWGQGTLLVTVSS	Варибельная тяжелая цепь (V _H) антитела против ВСМА
114	QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQHPGKAPKLMIEDSKRPSGVSNRFGS KSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSNTRSTLVF GGGTKLTVLG	Варибельная легкая цепь (V _L) антитела против ВСМА
115	ESKYGPPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSFLT VLHQ	Спейсер шарнир-C _H 2-C _H 3 Homo sapiens

	DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKLSLSLKG	
116	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDY SINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAY DFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTAT YFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSS	Вариабельная тяжелая цепь (V _H) антитела против ВСМА
117	DIVLTQSPPSLAMSGLKRATISCRASESVTILG SHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPA RFGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSR TIPRTFGGGTKLEIK	Вариабельная легкая цепь (V _L) антитела против ВСМА
118	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFTN FGMNWVKQAPGKGFKWMAWINTYTGESYF ADDFKGRFAFSVETSATTAYLQINNLKTEDT ATYFCARGEIYYGYDGGFA YWGQGT LTVS A	Вариабельная тяжелая цепь (V _H) антитела против ВСМА
119	DVVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDVN TAVSWYQQKPGQSPKLLIFSASYRYTGVPDR FTGSGSGADFTLTISSVQAEDLAVYYCQQHY STPWTFGGGTKLDIK	Вариабельная легкая цепь (V _L) антитела против ВСМА
120	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDSSTRYS PSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARYSGSFDNWGQGT LTVSS	Вариабельная тяжелая цепь (V _H) антитела против ВСМА
121	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSH SVNWFYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDG SLNGLVFGGGTKLTVLG	Вариабельная легкая цепь (V _L) антитела против ВСМА
122	GGGGS	Линкер
123	GGGS	Линкер
124	SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA	Линкер
125	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQ KFQGRVTMTEDTSTDATYMESSLRSEDYAV YYCARSGYSKIVSYMDYWGQGT LTVSS	Вариабельная тяжелая цепь (V _H) антитела против ВСМА
126	LPVLTQPPSTSGTPGQRVTVSCSGSSSNIGSN VFWYQQLPGTAPKLVIRNNQRPSGVPDRF SVKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDD SLSGYVFGTGTKVTVLG	Вариабельная легкая цепь (V _L) антитела против ВСМА
127	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGTANYAQ KFQGRVTITADESTSTAYMESSLRSEDYAV YYCARSGYGSYRWEDSWGQGT LTVSS	Вариабельная тяжелая цепь (V _H) антитела против ВСМА
128	QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSN YFWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDD SLSASYVFGTGTKVTVLG	Вариабельная легкая цепь (V _L) антитела против ВСМА
129	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYMHWRQAPGQRLEWMGWINPNSGGT NYAQKFQDRITVTRDTSSNTGYMELTRLRSD	Вариабельная тяжелая цепь (V _H) антитела против ВСМА

	DTAVYYCARSPYSGVLDKSWGQGLVTVSS	
130	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAG FDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYD SSLSGYVFGTGTKVTVLG	Варибельная легкая цепь (V _L) антитела против ВСМА
131	KYGPPCPPCP	Шарнир

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ стимуляции на колонке Т-клеток, включающий:

добавление олигомерного стимулирующего реагента, способного доставлять стимулирующий сигнал Т-клеткам к стационарной фазе, содержащей множество иммобилизованных Т-клеток, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками, где:

стационарная фаза содержит средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток или их подгруппы;

олигомерный стимулирующий реагент содержит одно или несколько стимулирующих средств, включающих (i) первое стимулирующее средство, представляющее собой антитело против CD3, и (ii) второе стимулирующее средство, представляющее собой антитело против CD28; и

в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

2. Способ стимуляции на колонке Т-клеток, включающий:

(a) инкубацию множества Т-клеток, иммобилизованных на стационарной фазе, с одним или несколькими стимулирующими средствами для доставки стимулирующего сигнала одной или нескольким Т-клеткам из множества Т-клеток, где указанная стационарная фаза содержит средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток, где специфическое связывание средства для отбора с селективным маркером, экспрессированным одной или несколькими Т-клетками, иммобилизует одну или несколько Т-клеток на стационарной фазе; и

(b) в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

3. Способ по п.2, где стационарная фаза содержит или имеет иммобилизованное по меньшей мере одно из одного или нескольких стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольким Т-клеткам.

4. Способ по п.2, где одно или несколько стимулирующих средств представляет собой первое стимулирующее средство и второе стимулирующее средство, и при этом, до инкубации, добавляют к стационарной фазе стимулирующий реагент, содержащий второе стимулирующее средство, способное усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал первого стимулирующего средства.

5. Способ по п.2, где способ включает, до инкубации, добавление стимулирующего реагента к стационарной фазе, где указанный стимулирующий реагент содержит по меньшей мере одно из одного или нескольких стимулирующих средств.

6. Способ по п.5, где по меньшей мере одно стимулирующее средство представляет собой первое стимулирующее средство, и одно или несколько стимулирующих средств

дополнительно содержит второе стимулирующее средство, способное усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал первого стимулирующего средства.

7. Способ по любому из пп. 2-6, где по меньшей мере одно из одного или нескольких стимулирующих средств, необязательно первое стимулирующее средство, является способным доставлять стимулирующий сигнал, где стимулирующий сигнал передается через комплекс TCR/CD3 в Т-клетке, содержащий CD3 комплекс в Т-клетке и/или содержащую ИТАМ молекулу в Т-клетке.

8. Способ по любому из пп. 4, 6, и 7, где второе стимулирующее средство является способным специфически связывать костимулирующую молекулу на одной или нескольких Т-клетках.

9. Способ стимуляции на колонке Т-клеток, включающий:

(а) добавление образца, содержащего множество Т-клеток, к стационарной фазе, где указанная стационарная фаза содержит средство для отбора, которое связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких из множества Т-клеток, таким образом, иммобилизацию одной или нескольких из множества Т-клеток на стационарной фазе;

(b) добавление, со стационарной фазой, стимулирующего реагента, содержащего одно или несколько стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольких из указанного множества Т-клеток, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками; и

(с) в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из указанного множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

10. Способ стимуляции на колонке Т-клеток, включающий:

(1) объединение (а) образца, содержащего множество Т-клеток, и (b) стационарной фазы, содержащей средство для отбора, способное специфически связывать селективный маркер, экспрессированный на поверхности одной или нескольких из множества Т-клеток, где специфическое связывание средства для отбора с селективным маркером иммобилизует указанную одну или несколько из множества Т-клеток на стационарной фазе;

(2) добавление, со стационарной фазой, стимулирующего реагента, содержащего одно или несколько стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал Т-клеткам, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками; и

(3) в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из указанного множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

11. Способ стимуляции на колонке Т-клеток, включающий добавление олигомерного стимулирующего реагента к стационарной фазе, содержащей множество

иммобилизованных Т-клеток, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками из множества иммобилизованных Т-клеток, где:

стационарная фаза содержит средство для отбора, которое специфически связывает селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток, где специфическое связывание средства для отбора с селективным маркером, экспрессированным одной или несколькими Т-клетками, иммобилизует указанную одну или несколько Т-клеток на стационарной фазе; и

олигомерный стимулирующий реагент содержит (i) множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и (ii) одно или несколько стимулирующих средств, способных доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольким Т-клеткам, где размер олигомерного стимулирующего реагента включает i) радиус более чем 50 нм, ii) молекулярную массу по меньшей мере 5×10^6 г/моль; и/или (iii) по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина на олигомерный стимулирующий реагент.

12. Способ по п.11, дополнительно включающий, в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

13. Способ по любому из пп. 1-10 или 12, где сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах приблизительно 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 часов от начала инкубации.

14. Способ по любому из пп. 1-10, 12, или 13, где сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах приблизительно 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 7-24, 8-24, 9-24, 10-24, 11-24, 12-24, 13-24, 14-24, 15-24, 16-24, 17-24, 18-24, 19-24, 20-24, 21-24, 22-24, 23-24, 2-23, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 или 2-3 часов от начала инкубации.

15. Способ по любому из пп. 1-10 или 12-14, где сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах приблизительно 12, 10, 8, 6, 4 или 2 часов от начала инкубации.

16. Способ по любому из пп. 1-10 или 12-15, где сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах 5 часов от начала инкубации.

17. Способ по любому из пп. 1-10 или 12-16, где сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах точно или приблизительно 4,5 часов от начала инкубации.

18. Способ по любому из пп. 1-10 или 12-17, где сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы происходит в пределах 4 часов от начала инкубации.

19. Способ по любому из пп. 1, 9, 10, и 13-17, где начало инкубации со стимулирующим реагентом происходит в пределах точно или приблизительно 10 минут, в пределах точно или приблизительно 20 минут, в пределах точно или приблизительно 30 минут, в пределах точно или приблизительно 45 минут, в пределах точно или приблизительно 60 минут, в пределах точно или приблизительно 90 минут или в пределах точно или приблизительно 120 минут после добавления или объединения образца, содержащего множество Т-клеток, к стационарной фазе или со стационарной фазой.

20. Способ по любому из пп. 1, 9, 10 и 13-19, где начало инкубации со стимулирующим реагентом происходит в пределах точно или приблизительно 60 минут после добавления или объединения образца, содержащего множество Т-клеток, к стационарной фазе или со стационарной фазой.

21. Способ по любому из пп. 9-20, где по меньшей мере одно из одного или нескольких стимулирующих средств является способным доставлять стимулирующий сигнал, где стимулирующий сигнал передается через комплекс TCR/CD3 в Т-клетке, содержащий CD3 комплекс в Т-клетке и/или содержащую ИТАМ молекулу в Т-клетке.

22. Способ по п.21, где по меньшей мере одно стимулирующее средство представляет собой первое стимулирующее средство, и стимулирующий реагент дополнительно содержит одно или несколько из вторых стимулирующих средств, способных усиливать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал первого стимулирующего средства.

23. Способ по любому из пп. 4, 6, 7 и 22, где второе стимулирующее средство является способным специфически связывать костимулирующую молекулу на одной или нескольких Т-клетках.

24. Способ по п.8 или п.23, где костимулирующая молекула выбрана среди CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 или HVEM.

25. Способ по п.8, п.23 или п.24, где второе стимулирующее средство является способным специфически связывать CD28, и/или костимулирующая молекула представляет собой CD28.

26. Способ по любому из пп. 14, 6, 7, 8 и 20-23, где первое стимулирующее средство специфически связывает CD3, и второе стимулирующее средство специфически связывает CD28.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где:

одно или несколько стимулирующих средств независимо представляет собой или содержит средство, выбранное из группы, состоящей из фрагментов антител, одновалентных фрагментов антител, белковых связывающих молекул с иммуноглобулиноподобными функциями, молекул, содержащих домены Ig, цитокинов,

хемокинов, аптамеров, молекул МНС, комплексов МНС-пептид; лигандов рецепторов; и их связывающих фрагментов.

28. Способ по любому из пп. 4, 6, 7, 8 или 13-20, 22-264, где:

первое и второе стимулирующие средства независимо представляют собой или содержат средство, выбранное из группы, состоящей из фрагментов антител, одновалентных фрагментов антител, белковых связывающих молекул с иммуноглобулиноподобными функциями, молекул, содержащих домены Ig, цитокинов, хемокинов, аптамеров, молекул МНС, комплексов МНС-пептид; лигандов рецепторов; и их связывающих фрагментов.

29. Способ по любому из пп. 1-27, где одно или несколько стимулирующих средств содержит одновалентный фрагмент антитела.

30. Способ по любому из пп. 1, 4, 6, 7, 8, 13-20, 22-26, и 28, где первое и второе стимулирующие средства независимо содержат одновалентный фрагмент антитела.

31. Способ по любому из пп. 1, 4, 6, 7, 8, 13-20, 22-26, 28 и 30, где первое стимулирующее средство содержит одновалентный фрагмент антитела, связывающий CD3, и второе стимулирующее средство содержит одновалентный фрагмент антитела, связывающий CD28.

32. Способ по любому из пп. 27-31, где одновалентный фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента Fv и одноцепочечного фрагмента Fv (scFv).

33. Способ по любому из пп. 1, 4, 6, 7, 8, 13-20, 22-26, 28 и 30-32, где первое стимулирующее средство представляет собой Fab против CD3, и второе стимулирующее средство представляет собой Fab против CD28.

34. Способ стимуляции на колонке Т-клеток, включающий добавление олигомерного стимулирующего реагента, способного доставлять стимулирующий сигнал Т-клеткам к стационарной фазе, содержащей множество иммобилизованных Т-клеток, таким образом, начало инкубации стимулирующего реагента с одной или несколькими Т-клетками, где:

стационарная фаза содержит средство для отбора, способное специфически связывать селективный маркер на поверхности одной или нескольких Т-клеток или их подгруппы, где специфическое связывание средства для отбора с селективным маркером, экспрессированным одной или несколькими Т-клетками или их подгруппой, иммобилизует указанное по меньшей мере множество Т-клеток на стационарной фазе, и где средство для отбора представляет собой фрагмент Fab, способный специфически связывать селективный маркер, выбранный из группы, состоящей из CD3, CD4, и CD8;

олигомерный стимулирующий реагент содержит (i) множество молекул мутеина стрептавидина, (ii) первое стимулирующее средство, способное доставлять стимулирующий сигнал одной или нескольким Т-клеткам, где первое стимулирующее средство представляет собой фрагмент Fab, способный специфически связывать CD3, и (iii) второе стимулирующее средство, способное усиливать, ослаблять или

модифицировать стимулирующий сигнал, где второе стимулирующее средство представляет собой фрагмент Fab, способный специфически связывать CD28, и где размер олигомерного стимулирующего реагента включает i) радиус более чем 50 нм, ii) молекулярную массу по меньшей мере 5×10^6 г/моль; и/или (iii) по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина на олигомерный стимулирующий реагент; и

в пределах 24 часов от начала инкубации, сбор одной или нескольких из множества Т-клеток из стационарной фазы под действием силы тяжести, таким образом, получение композиции, содержащей стимулированные Т-клетки.

35. Способ по любому из пп. 1-34, где Т-клетки происходят из образца, который представляет собой или содержит образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), образец нефракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкофереза.

36. Способ по любому из пп. 35, где образец представляет собой продукт афереза или лейкофереза.

37. Способ по любому из пп. 36, где продукт афереза или лейкофереза ранее подвергнут криозамораживанию.

38. Способ по любому из пп. 2-27, и 29 где инкубация с одним или несколько стимулирующих средств высвобождает одну или несколько из множества иммобилизованных Т-клеток из стационарной фазы.

39. Способ по любому из пп. 1, 4, 6, 7, 8, 13-20, 22-26, 28, 30-38, где инкубация с первым и вторым стимулирующими средствами высвобождает одну или несколько из множества иммобилизованных Т-клеток из стационарной фазы.

40. Способ по любому из пп. 1-27, 29, и 35-28, где:

одно или несколько стимулирующих средств дополнительно содержит биотин, аналог биотина, который обратимо связывает стрептавидин или авидин, связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19), связывающий кальмодулин пептид, который обратимо связывает кальмодулин, пептид FLAG, который обратимо связывает антитело, связывающее пептид FLAG, и олигогистидиновую метку, которая обратимо связывает антитело, связывающее олигогистидиновую метку.

41. Способ по п.1-27, 29, и 35-40, где одно или несколько стимулирующих средств дополнительно содержит связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы,

состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19).

42. Способ по п.1-27, 29 и 35-41, где одно или несколько стимулирующих средств дополнительно содержит связывающий стрептавидин пептид, имеющий последовательность SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16).

43. Способ по любому из пп. 1, 4, 6, 7, 8, 13-20, 22-26, 28, 30-39, где:

первое стимулирующее средство и второе стимулирующее средство, независимо, дополнительно содержат биотин, аналог биотина, который обратимо связывает стрептавидин или авидин, связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19), связывающий кальмодулин пептид, который обратимо связывает кальмодулин, пептид FLAG, который обратимо связывает антитело, связывающее пептид FLAG, и олигогистидиновую метку, которая обратимо связывает антитело, связывающее олигогистидиновую метку.

44. Способ по п.1, 4, 6, 7, 8, 13-20, 22-26, 28, 30-39 и 43, где каждое из первого и второго стимулирующего средства дополнительно содержит связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19).

45. Способ по п.1, 4, 6, 7, 8, 13-20, 22-26, 28, 30-39, 43 и 44, где каждое из первого и второго стимулирующего средства дополнительно содержит связывающий стрептавидин пептид, имеющий последовательность SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16).

46. Способ по любому из пп. 1-45, где средство для отбора представляет собой или содержит средство, выбранное из группы, состоящей из фрагментов антител, одновалентных фрагментов антител, белковых связывающих молекул с

иммуноглобулиноподобными функциями, молекул, содержащих домены Ig, цитокинов, хемокинов, аптамеров, молекул МНС, комплексов МНС-пептид; лигандов рецепторов; и их связывающих фрагментов.

47. Способ по любому из пп. 1-46, где:

селективный маркер представляет собой Т-клеточный корецептор;

селективный маркер представляет собой или содержит член комплекса Т-клеточного рецептора антигена;

селективный маркер представляет собой или содержит цепь CD3;

селективный маркер представляет собой или содержит цепь CD3-дзета;

селективный маркер представляет собой или содержит CD8;

селективный маркер представляет собой или содержит CD4;

селективный маркер представляет собой или содержит CD45RA;

селективный маркер представляет собой или содержит CD27;

селективный маркер представляет собой или содержит CD28; и/или

селективный маркер представляет собой или содержит CCR7.

48. Способ по любому из пп. 1-47, где селективный маркер выбран из группы, состоящей из CD3, CD4 и CD8.

49. Способ по любому из пп. 1-48, где селективный маркер представляет собой CD3.

50. Способ по любому из пп. 1-49, где средство для отбора дополнительно содержит биотин, аналог биотина, который обратимо связывает стрептавидин или авидин, связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19), связывающий кальмодулин пептид, который обратимо связывает кальмодулин, пептид FLAG, который обратимо связывает антитело, связывающее пептид FLAG, и олигогистидиновую метку, которая обратимо связывает антитело, связывающее олигогистидиновую метку.

51. Способ по любому из пп. 1-50, где средство для отбора дополнительно содержит биотин, аналог биотина, который обратимо связывает стрептавидин или авидин, связывающий стрептавидин пептид, выбранный из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-

Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19).

52. Способ по любому из пп. 1-51, где средство для отбора дополнительно содержит связывающий стрептавидин пептид, имеющий последовательность SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16).

53. Способ по любому из пп. 1-52, где специфическое связывание между средством для отбора и селективным маркером не индуцирует сигнал, или не индуцирует стимулирующий или активирующий, или пролиферативный сигнал, для Т-клеток.

54. Способ по любому из пп. 1-53, где средство для отбора содержит одновалентный фрагмент антитела, связывающий CD3, CD8 или CD4.

55. Способ по любому из пп. 1-54, где средство для отбора представляет собой Fab против CD3, Fab против CD8 или Fab против CD4.

56. Способ по любому из пп. 1-55, где средство для отбора представляет собой Fab против CD3.

57. Способ по любому из пп. 4-10, 13-33, и 35-56, где стимулирующий реагент представляет собой олигомерный стимулирующий реагент, содержащий множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, где размер частицы олигомерного стимулирующего реагента включает i) радиус более чем 50 нм, ii) молекулярную массу по меньшей мере 5×10^6 г/моль; и/или (iii) по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина на олигомерный стимулирующий реагент.

58. Способ по п.1, где олигомерный стимулирующий реагент содержит множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, где размер частицы олигомерного стимулирующего реагента включает i) радиус более чем 50 нм, ii) молекулярную массу по меньшей мере 5×10^6 г/моль; и/или (iii) по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина на олигомерный стимулирующий реагент.

59. Способ по п.1, 11-58, где олигомерный стимулирующий реагент является растворимым.

60. Способ по любому из пп. 1, 11-59, где:

олигомерный стимулирующий реагент не является растворимым и не является связанным с или ассоциированным с твердой подложкой, стационарной фазой, бусиной, микрочастицей, магнитной частицей и/или матриксом; и/или

реагент является гибким, не содержит металлический или магнитный кор, состоит полностью или преимущественно из органического мультимера, и/или не является жестким.

61. Способ по любому из пп. 11-60, где молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина обратимо связывают или являются способными обратимо связывать биотин, аналог биотина или связывающий стрептавидин пептид.

62. Способ по любому из пп. 11-61, где:

мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность $\text{Pe}^{44}\text{-Gly}^{45}\text{-Ala}^{46}\text{-Arg}^{47}$ в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47, со

ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:1; или

мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47, со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 1.

63. Способ по любому из пп. 61 или 62, где связывающий стрептавидин пептид выбран из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHQPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19).

64. Способ по любому из пп. 1 и 11--63, где олигомерный стимулирующий реагент имеет:

радиус более чем 60 нм, более чем 70 нм, более чем 80 нм или более чем 90 нм.

65. Способ по любому из пп. 1 и 11-64, где олигомерный стимулирующий реагент имеет:

радиус между 50 нм и 150 нм, между 75 нм и 125 нм, между 80 нм и 115 нм, или между 90 нм и 110 нм, включительно; или

радиус 90 нм ±15 нм или 95 нм±20-25 нм.

66. Способ по любому из пп. 1164, где радиус представляет собой гидродинамический радиус.

67. Способ по любому из пп. 1 и 11-66, где олигомерный стимулирующий реагент имеет молекулярную массу:

по меньшей мере 5×10^7 г/моль, или по меньшей мере 1×10^8 г/моль; и/или между 5×10^7 г/моль и 5×10^8 г/моль, между 1×10^8 г/моль и 5×10^8 г/моль, или между 1×10^8 г/моль и 2×10^8 г/моль.

68. Способ по любому из пп. 1 и 11-67, где олигомерный стимулирующий реагент содержит по меньшей мере 500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере 1000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере 1500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, или по меньшей мере 2000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина; и/или;

между 1000 и 20000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, между 1000 и 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, или между 2000 и 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина.

69. Способ по любому из пп. 1 и 11-68, где олигомерный стимулирующий реагент добавляют к стационарной фазе в концентрации между приблизительно 1 до приблизительно 2 мкг/1 миллион клеток.

70. Способ по любому из пп. 1-69, где средство для отбора напрямую или опосредованно связано со стационарной фазой.

71. Способ по любому из пп. 1-70, где средство для отбора связано опосредованно со стационарной фазой посредством реагента для отбора, с которым средство для отбора обратимо связывается.

72. Способ по п.70 или п.71, где реагент для отбора представляет собой или содержит стрептавидин, авидин, мутеин стрептавидаина, который обратимо связывает биотин, аналог биотина или его биологически активный фрагмент; мутеин авидина или стрептавидаина, который обратимо связывает связывающий стрептавидин пептид; реагент, который содержит по меньшей мере две хелатирующие группы К, где по меньшей мере две хелатирующие группы являются способными связывать ион переходного металла; средство, способное связывать олигогистидиновую аффинную метку; средство, способное связывать глутатион-S-трансферазу; кальмодулин или его аналог; средство, способное связывать связывающий кальмодулин пептид (CBP); средство, способное связывать FLAG-пептид; средство, способное связывать HA-метку; средство, способное связывать связывающий мальтозу белок (MBP); средство, способное связывать эпитоп HSV; средство, способное связывать эпитоп тус; или средство, способное связывать биотинилированный белок-носитель.

73. Способ по любому из пп. 70-72, где:

реагент для отбора представляет собой или содержит мутеин стрептавидаина или мутеин авидина, который обратимо связывает биотин или биологически активный фрагмент;

стимулирующий реагент представляет собой или содержит мутеин стрептавидаина или мутеин авидина, который обратимо связывает аналог или биологически активный фрагмент биотина; и/или

стимулирующий реагент представляет собой или содержит мутеин стрептавидаина или мутеин авидина, который обратимо связывает связывающий стрептавидин пептид.

74. Способ по п.72 или п.73, где молекулы стрептавидаина или мутеина стрептавидаина обратимо связывают или являются способными обратимо связывать биотин, аналог биотина или связывающий стрептавидин пептид.

75. Способ по любому из пп. 72-74, где:

мутеин стрептавидаина содержит аминокислотную последовательность $\text{Pc}^{44}\text{-Gly}^{45}\text{-Ala}^{46}\text{-Arg}^{47}$ в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47, со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:1; или

мутеин стрептавидаина содержит аминокислотную последовательность $\text{Val}^{44}\text{-Thr}^{45}\text{-Ala}^{46}\text{-Arg}^{47}$ в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47, со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 1.

76. Способ по любому из пп. 72-75, где связывающий стрептавидин пептид выбран из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂ Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19).

77. Способ по любому из пп. 72-76, где связывающий стрептавидин пептид имеет последовательность SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16).

78. Способ по любому из пп. 1-10 или 12-77, где указанный сбор под действием силы тяжести включает добавление сред к стационарной фазе, где среды не содержат конкурентное средство или свободное связывающее средство для элюции Т-клеток из стационарной фазы.

79. Способ по любому из пп. 1-10 и 12-78, где указанная композиция, содержащая стимулированные Т-клетки, не содержит конкурентное средство или свободное связывающее средство.

80. Способ по п.78 или 79, где указанное конкурентное средство или свободное связывающее средство представляет собой или содержит биотин или аналог биотина, необязательно, где аналог биотина представляет собой D-биотин.

81. Способ по любому из пп. 1-78, дополнительно включающий введение рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты в стимулированные Т-клетки из композиции, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует рекомбинантный белок, таким образом, получение композиции, содержащей модифицированные Т-клетки, необязательно, трансдуцированные Т-клетки.

82. Способ по п.81, где рекомбинантный белок представляет собой рецептор антигена.

83. Способ по п.81 или п.82, где рекомбинантный белок представляет собой химерный рецептор антигена.

84. Способ по п.83, где химерный рецептор антигена (CAR) содержит внеклеточный узнающий антиген домен, которое специфически связывает антиген-мишень, и внутриклеточный передающий сигналы домен, содержащий ITAM.

85. Способ по п.84, где внутриклеточный передающий сигналы домен содержит внутриклеточный домен цепи CD3-дзета (CD3ζ).

86. Способ по п.84 или п.85, дополнительно включающий трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный передающий сигналы домен.

87. Способ по п.86, где трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28.

88. Способ по любому из пп. 84-87, где внутриклеточный передающий сигналы домен дополнительно содержит внутриклеточный передающий сигналы домен из Т-клеточной костимулирующей молекулы.

89. Способ по п.88, где Т-клеточная костимулирующая молекула выбрана из группы, состоящей из CD28 и 41BB.

90. Способ по любому из пп. 81-89, где нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей рекомбинантный рецептор антигена.

91. Способ по любому из пп. 81-90, где введение рекомбинантной нуклеиновой кислоты осуществляют посредством трансдукции с использованием вирусной частицы.

92. Способ по п.91, где вирусная частица представляет собой частицу ретровирусного вектора.

93. Способ по п.91 или п.92, где вирусная частица представляет собой частицу лентивирусного вектора.

94. Способ по любому из пп. 81-93, дополнительно включающий инкубацию композиции, содержащей трансдуцированные клетки, в условиях для интеграции вируса, необязательно, при температуре точно или приблизительно $37^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

95. Способ по п.94, где инкубацию композиции, содержащей трансдуцированные клетки, проводят в течение вплоть до 96 часов после введения.

96. Способ по п.94, где инкубацию композиции, содержащей трансдуцированные клетки, проводят в течение вплоть до 72 часов после введения.

97. Способ по п.94, где инкубацию композиции, содержащей трансдуцированные клетки, проводят в течение вплоть до 48 часов после введения.

98. Способ по п.94, где инкубацию композиции, содержащей трансдуцированные клетки, проводят в течение вплоть до 24 часов после введения.

99. Способ по любому из пп. 94-98, где инкубацию композиции, содержащей трансдуцированные клетки, проводят в течение по меньшей мере 18 часов после введения.

100. Способ по любому из пп. 81-99, дополнительно включающий культивирование композиции, содержащей модифицированные клетки, необязательно, трансдуцированные клетки, в условиях для размножения Т-клеток.

101. Способ по п.100, где культивирование проводят в течение времени, составляющего не более чем 14 суток, не более чем 12 суток, не более чем 10 суток, не более чем 8 суток, не более чем 6 суток или не более чем 5 суток.

102. Способ по любому из пп. 81-101, дополнительно включающий сбор модифицированных Т-клеток, таким образом, получение выходной популяции модифицированных Т-клеток.

103. Способ по любому из пп. 81-99, дополнительно включающий сбор модифицированных Т-клеток на время между 48 и 120 часов, включительно, после начала воздействия стимулирующего реагента.

104. Способ по любому из пп. 81-99 и 103, где сбор проводят в пределах 120 часов после начала воздействия стимулирующего средства.

105. Способ по любому из пп. 81-99 и 103, где сбор проводят в пределах 96 часов после начала воздействия стимулирующего средства.

106. Способ по любому из пп. 81-99 и 105, где сбор проводят в пределах 72 часов после начала воздействия стимулирующего средства.

107. Способ по любому из пп. 81-99 и 106, где сбор проводят в пределах 48 часов после начала воздействия стимулирующего средства.

108. Способ по любому из пп. 102-107, где на время сбора, процент подобных наивным клеток составляет более чем или более чем приблизительно 60% среди тотальных Т-клеток в популяции, тотальных CD4+ Т-клеток в популяции или тотальных CD8+ Т-клеток, или экспрессирующих рекомбинантный белок клеток из них, в популяции.

109. Способ по п.108, где подобные наивным Т-клетки содержат CD27+CCR7+ клетки.

110. Способ по любому из пп. 81-93, где введение проводят в бессывороточных средах.

111. Способ по любому из пп. 94-99, где инкубацию проводят в бессывороточных средах.

112. Способ по п.100 или п.101, где культивирование проводят в бессывороточных средах.

113. Способ по любому из пп. 110-112, где бессывороточная среда содержит:

0,5 мМ-5 мМ дипептидную форму L-глутамин в основных средах;

0,5 мМ-5 мМ L-глутамин; и

необязательно, по меньшей мере один белок,

где среда не содержит сыворотку.

114. Способ по любому из пп. 110-113, где бессывороточная среда содержит рекомбинантный цитокин, выбранный среди IL-2, IL-15 и IL-7, необязательно рекомбинантный человеческий IL-2, рекомбинантный человеческий IL-15 и/или рекомбинантный человеческий IL-7.

115. Способ по любому из пп. 110-114, где бессывороточная среда не содержит рекомбинантный цитокин, выбранный среди IL-2, IL-15 и IL-7, необязательно, рекомбинантный человеческий IL-2, рекомбинантный человеческий IL-15 и/или рекомбинантный человеческий IL-7.

116. Способ по любому из пп. 81-93, дополнительно включающий добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства к композиции, содержащей модифицированные клетки, необязательно, трансдуцированные Т-клетки, необязательно, где средство добавляют в условиях для диссоциации одного или нескольких стимулирующих средств от олигомерного стимулирующего реагента в композиции.

117. Способ по любому из пп. 94-99, дополнительно включающий добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства к композиции, содержащей инкубированные Т-клетки, необязательно, в условиях для диссоциации одного или нескольких стимулирующих средств от олигомерного стимулирующего реагента в композиции.

118. Способ по любому из пп. 100-101, дополнительно включающий добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства к композиции, содержащей культивированные Т-клетки, необязательно в условиях для диссоциации одного или нескольких стимулирующих средств от олигомерного стимулирующего реагента в композиции.

119. Способ по любому из пп. 116-118, где добавление конкурентного средства или свободного связывающего средства проводят до сбора.

120. Способ по любому из пп. 116-119, где конкурентное средство или свободное связывающее средство не является вредным для Т-клеток, и/или где добавление указанного вещества не уменьшает процент выживания Т-клеток до менее чем 90%, 80%, 70%, 60% или 50%, по сравнению с инкубацией Т-клеток, в сравнимых или таких же условиях, в отсутствие конкурентного средства или свободного связывающего средства.

121. Способ по любому из пп. 116-120, где указанная диссоциация прекращает или уменьшает стимулирующий сигнал в Т-клетках.

122. Способ по любому из пп. 116-121, где:

конкурентный реагент и свободное связывающее средство независимо содержат молекулу из группы, состоящей из: связывающих стрептавидин молекул; биотина; D-биотина; аналогов биотина; аналогов биотина, которые специфически связывают стрептавидин или аналог стрептавида, имеющий аминокислотную последовательность Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ или Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47 стрептавида дикого типа; или

конкурентный реагент и свободное связывающее средство независимо содержат хелатор металла, который, необязательно, представляет собой EDTA или EGTA.

123. Способ по любому из пп. 116-122, где конкурентный реагент и свободное связывающее средство независимо содержат D-биотин, необязательно 1 мМ D-биотин.

124. Способ по любому из пп. 81-123, дополнительно включающий промывку клеток, необязательно, где промывка приводит к уменьшению количества или удалению стимулирующего реагента и/или одного или нескольких стимулирующих средств в композиции.

125. Способ по п.124, где промывку проводят до сбора.

126. Способ по любому из пп. 1-125, где Т-клетки содержат антигенспецифические Т-клетки или их популяцию, Т-клетки-помощники или их популяцию, цитотоксические Т-клетки или их популяцию, Т-клетки памяти или их популяцию, или регуляторные Т-клетки или их популяцию.

127. Способ по любому из пп. 1-126, где Т-клетки содержат CD3+ Т-клетки или содержат CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

128. Способ по любому из пп. 1-127, где способ включает отбор подгруппы Т-клеток из стимулированных Т-клеток из композиции до введения по любому из пп. 81-93, где рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты вводят в отобранную подгруппу Т-клеток.

129. Способ по любому из пп. 1-128, где способ включает отбор подгруппы Т-клеток из композиции, содержащей трансдуцированные клетки, до инкубации по любому из пп. 94-99, где отобранную подгруппу Т-клеток инкубируют в условиях для интеграции вируса.

130. Способ по любому из пп. 1-129, где способ включает отбор подгруппы Т-клеток из композиции, содержащей модифицированные клетки, до культивирования по любому из пп. 100-101, где отобранную подгруппу Т-клеток культивируют в условиях для размножения Т-клеток.

131. Способ по любому из пп. 1-130, где способ включает отбор подгруппы Т-клеток из композиции, содержащей модифицированные клетки, до сбора по любому из пп. 102-109, где отобранную подгруппу Т-клеток собирают для получения выходной популяции модифицированных Т-клеток.

132. Способ по п.129-131, где подгруппа Т-клеток представляет собой подобные наивным Т-клетки или представляет собой Т-клетки, поверхность которых является положительной по маркеру, экспрессированному на подобных наивным Т-клетках, представляющие собой CCR7+CD45RA+, CD27+CCR7+ или CD62L-CCR7+.

133. Способ по п.129 или п.132, где подобные наивным Т-клетки содержат CD27+CCR7+ Т-клетки.

134. Способ по п.129 или п.132, где подобные наивным Т-клетки содержат CCR7+CD45RA+ Т-клетки.

135. Способ по любому из пп. 129-134, где подгруппа Т-клеток экспрессирует рекомбинантный белок, необязательно химерный рецептор антигена.

136. Способ по любому из пп. 129-135, где отбор подгруппы Т-клеток проводят посредством аффинной хроматографии на колонке.

137. Способ по любому из пп. 102-108, 125, и 129-136, дополнительно включающий составление собранных клеток для криоконсервации и/или введения субъекту, необязательно, в присутствии фармацевтически приемлемого наполнителя.

138. Способ по п.102-108, 125, и 129-137, где собранные клетки составляют в присутствии криопротектора.

139. Способ по любому из пп. 1-138, где стационарная фаза представляет собой или содержит хроматографический матрикс.

140. Способ по любому из пп. 1-139, где стационарная фаза имеет емкость связывания, необязательно, емкость статического связывания или емкость динамического

связывания, между приблизительно 75 миллионов и приблизительно 125 миллионов Т-клеток на мл стационарной фазы.

141. Способ по любому из пп. 1-140, где:

(а) стационарная фаза составляет приблизительно 20 мл; и/или

(b) стационарная фаза имеет емкость связывания $2 \text{ миллиарда} \pm 0,5 \text{ миллиардов}$ клеток.

142. Способ по любому из пп. 1-141, включающий две стационарные фазы.

143. Способ по любому из пп. 142, где две стационарные фазы аранжированы параллельно.

144. Способ по любому из пп. 142, где две стационарные фазы аранжированы последовательно.

145. Изделие для стимуляции Т-клеток на колонке, содержащее:

(а) первое стимулирующее средство и второе стимулирующее средство, способные специфически связывать первую молекулу и вторую молекулу, соответственно, на поверхности Т-клетки, таким образом, стимулировать Т-клетку; и

(b) стационарную фазу, содержащую средство для отбора, способное специфически связывать селективный маркер на Т-клетке, таким образом, иммобилизовать Т-клетку на стационарной фазе.

146. Изделие по п.145, где стационарная фаза дополнительно содержит первое стимулирующее средство и второе стимулирующее средство.

147. Изделие по п.145 или п.146, где первое стимулирующее средство, второе стимулирующее средство, и средство для отбора связаны опосредованно со стационарной фазой посредством реагента для отбора.

148. Изделие по п.145, дополнительно включающее стимулирующий реагент, где первое и второе стимулирующие средства являются обратимо связанными или способными к обратимому связыванию.

149. Изделие по п.145, где средство для отбора связано опосредованно со стационарной фазой посредством реагента для отбора.

150. Изделие по любому из пп. 145-149, где стационарная фаза представляет собой или содержит хроматографический матрикс, и где изделие дополнительно содержит контейнер, в котором содержится весь или часть хроматографического матрикса.

151. Изделие по любому из пп. 145-150, содержащее две стационарные фазы.

152. Изделие по любому из пп. 151, где две стационарные фазы аранжированы параллельно.

153. Изделие по любому из пп. 151, где две стационарные фазы аранжированы последовательно.

154. Устройство, содержащее изделие по любому из пп. 145-153.

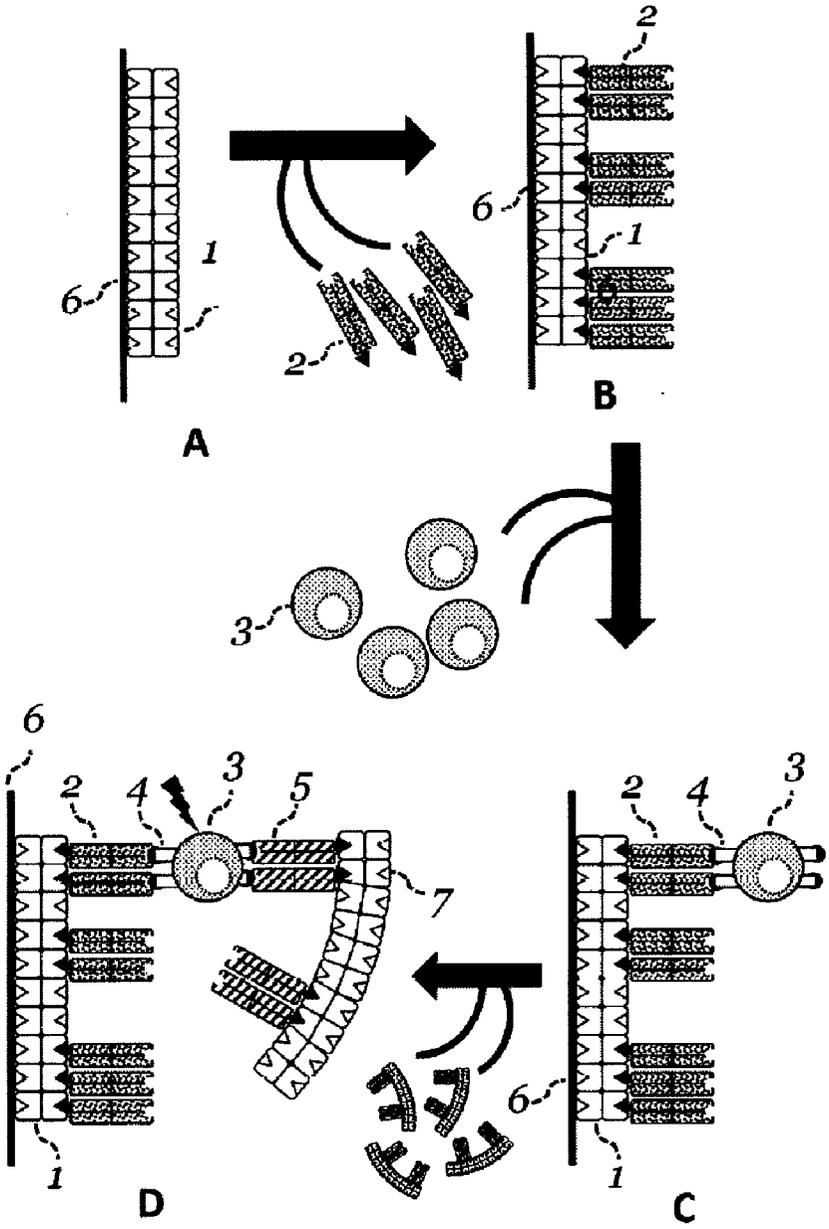
155. Устройство по п.154, дополнительно содержащее впускное отверстие для жидкости, соединенное, с возможностью переноса жидкости, с одним или несколькими

компонентами устройства, и/или выпускное отверстие для жидкости, соединенное, с возможностью переноса жидкости, с одним или несколькими компонентами устройства.

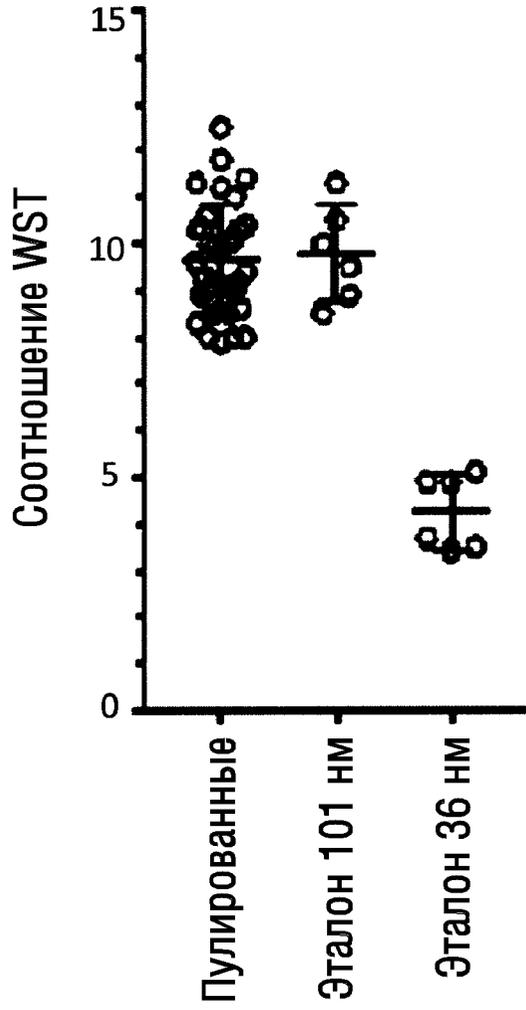
156. Устройство по любому из пп. 154 или 155, которое находится в закрытой или стерильной системе.

157. Устройство по любому из пп. 154-156 или изделие по любому из пп. 145-153, для применения в способе по любому из пп. 1-144, где способ, необязательно, осуществляют автоматизированным образом.

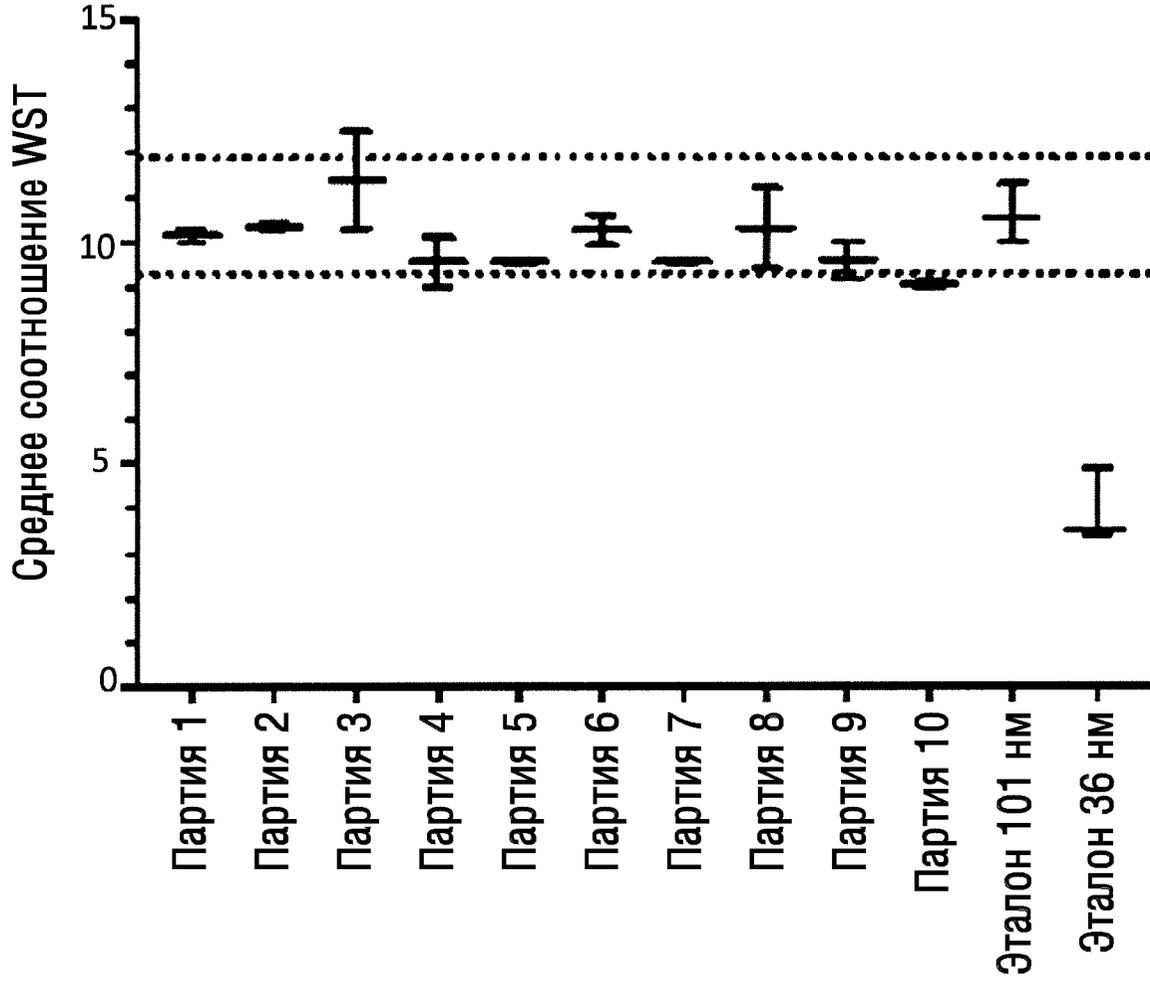
ФИГ.1



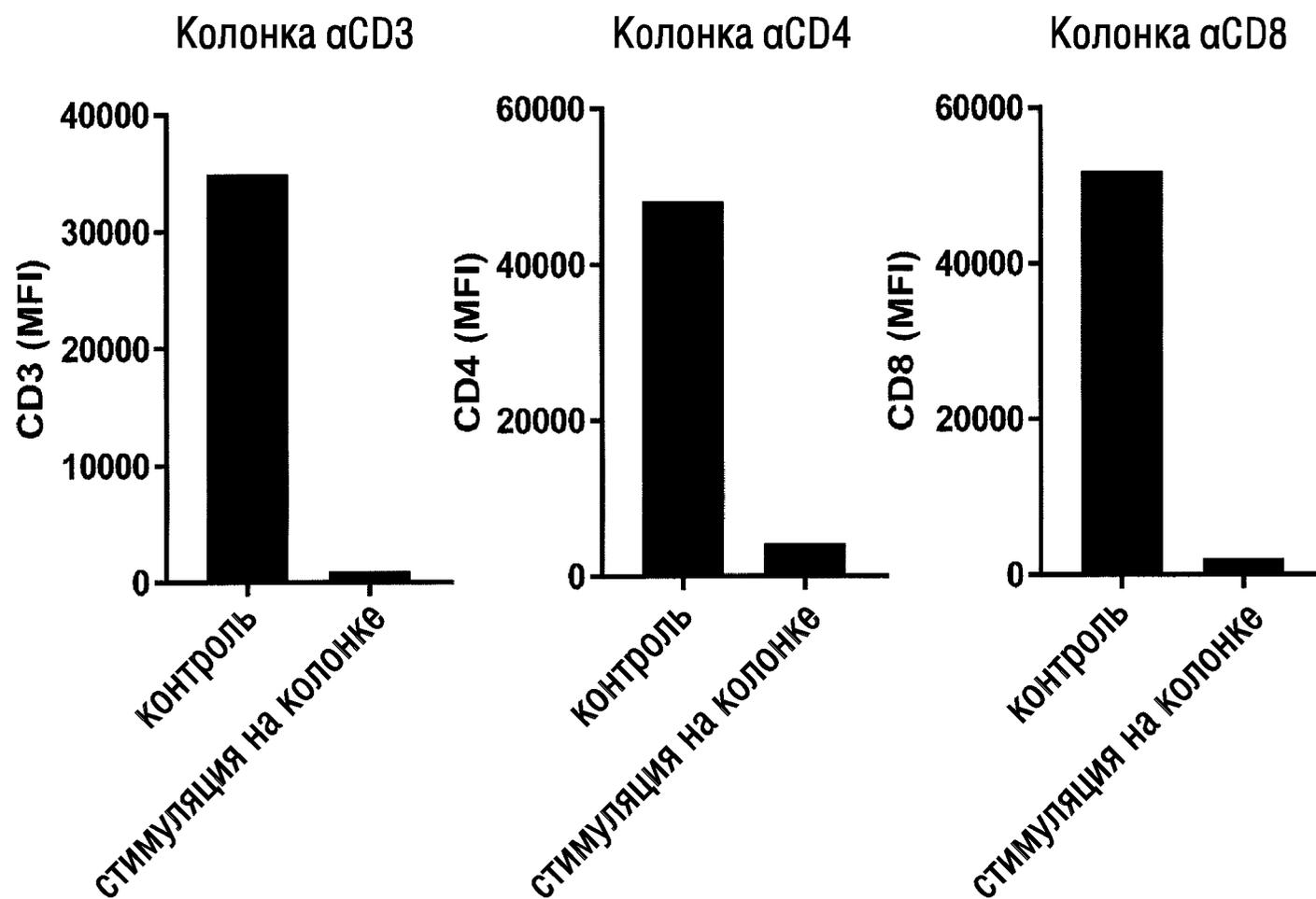
ФИГ.2А



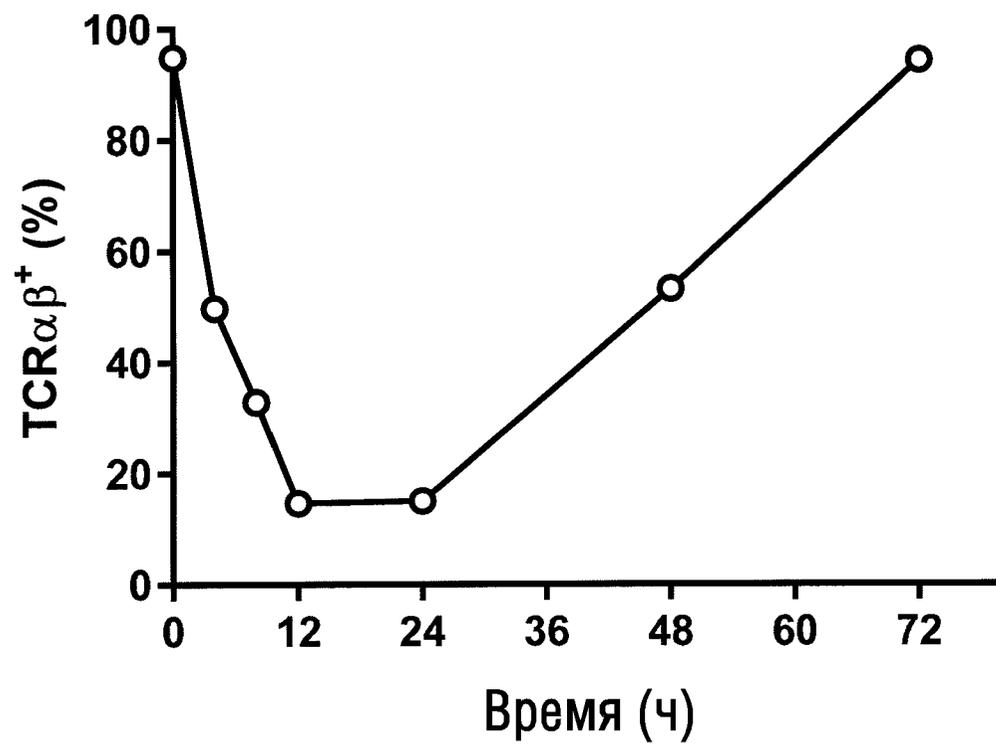
ФИГ.2В



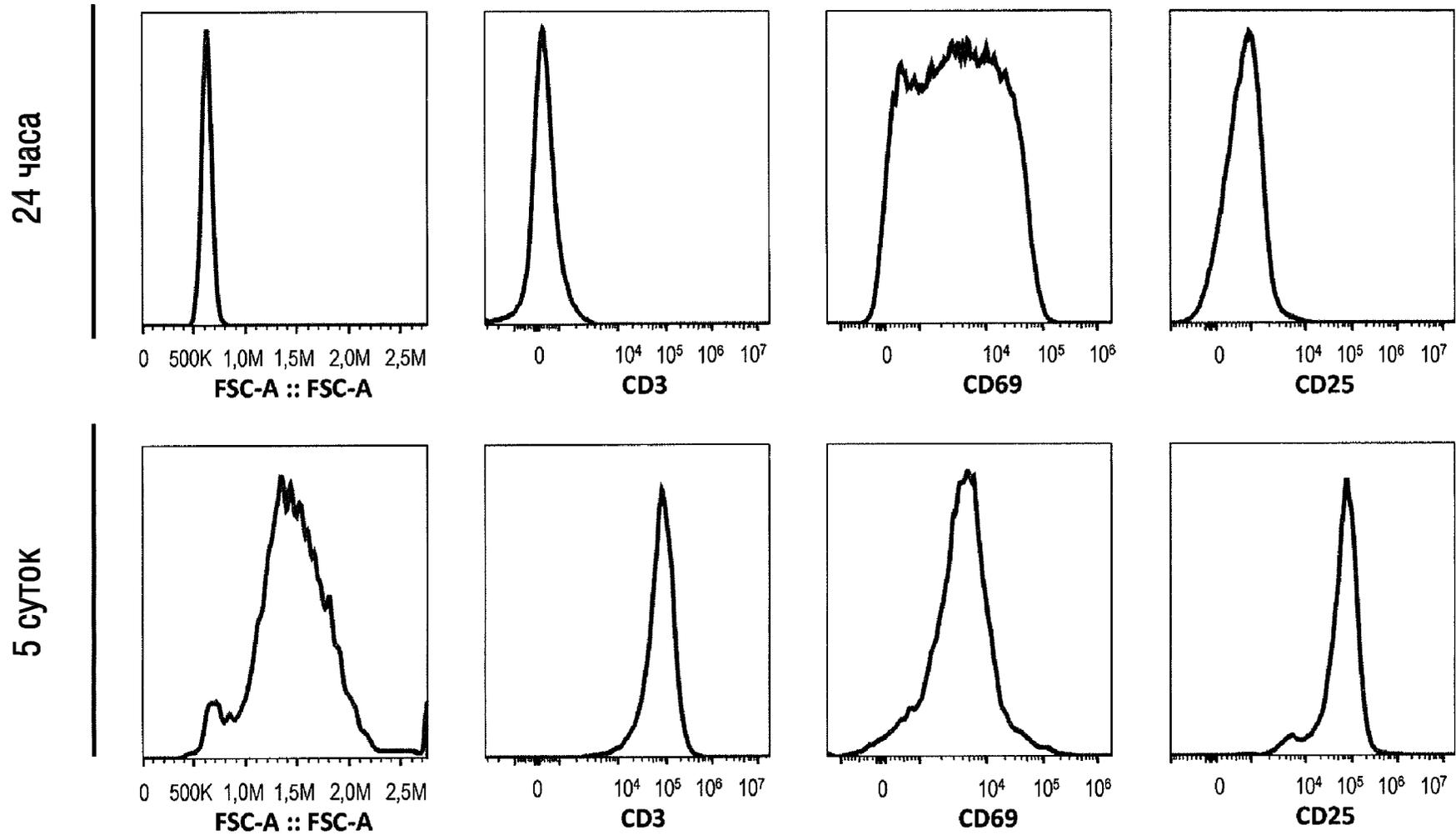
ФИГ.3



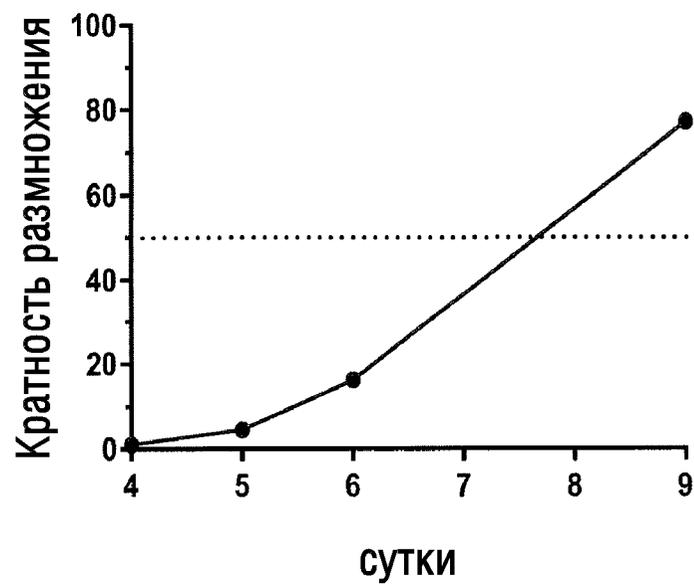
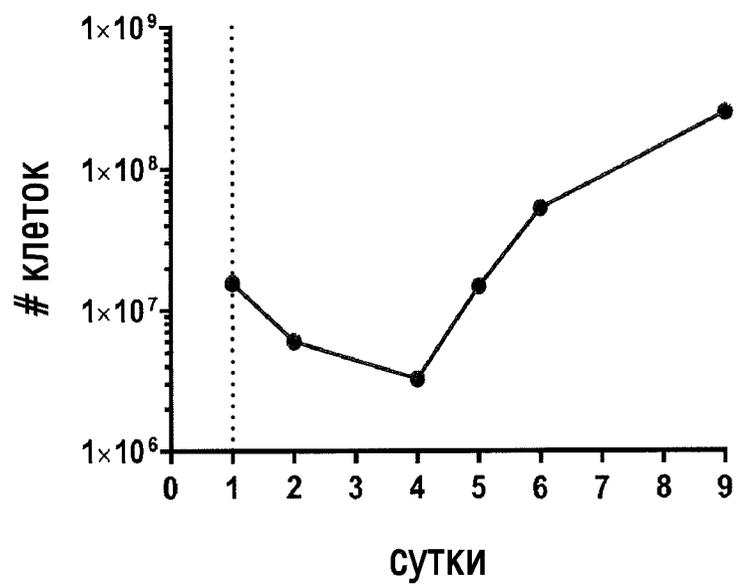
ФИГ.4



ФИГ.5А

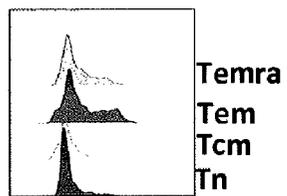


ФИГ.5В

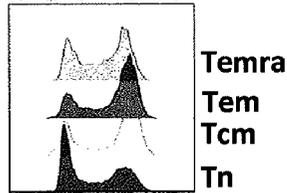


ФИГ.6А

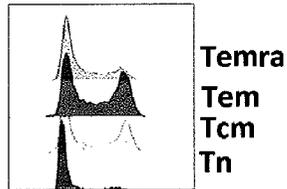
Без стимуляции
(только среды)



Олигомерный реагент
против CD3/CD28



Олигомерный реагент
против CD3/CD28 +
соединение 63

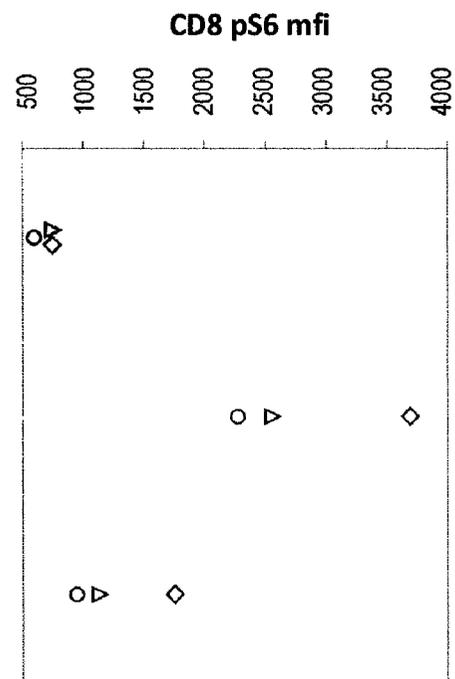


ФИГ.6В

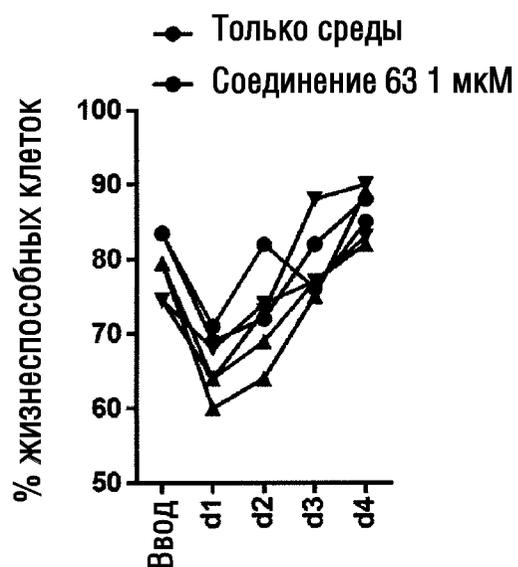
Без стимуляции
(только среды)

Олигомерный реагент
против CD3/CD28

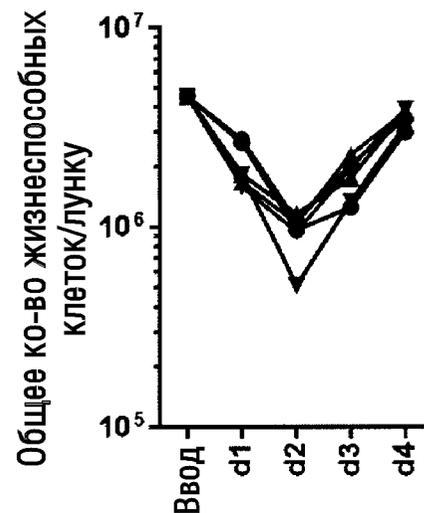
Олигомерный реагент
против CD3/CD28 +
соединение 63



ФИГ.6С

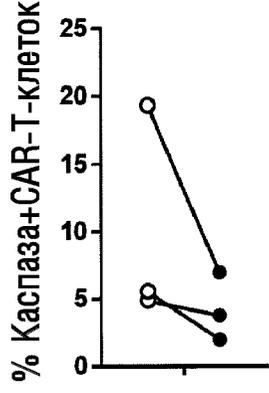


ФИГ.6D

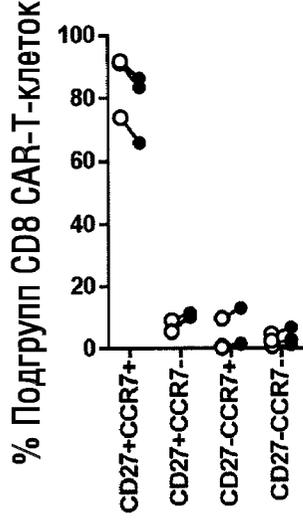


○ Без соединения 63
● С соединением 63

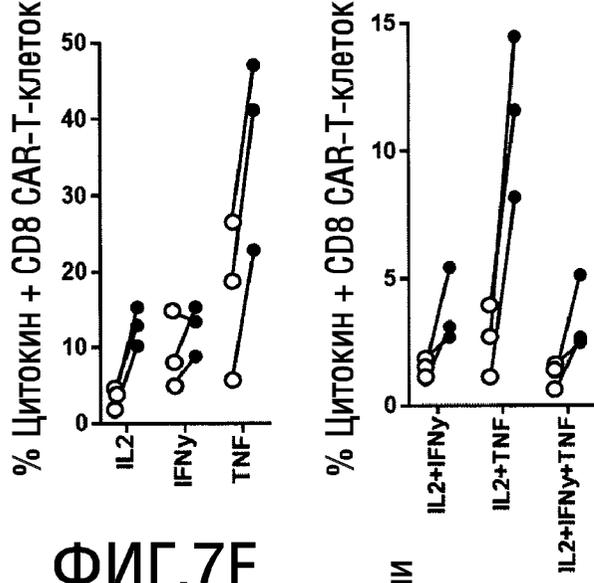
ФИГ.7А



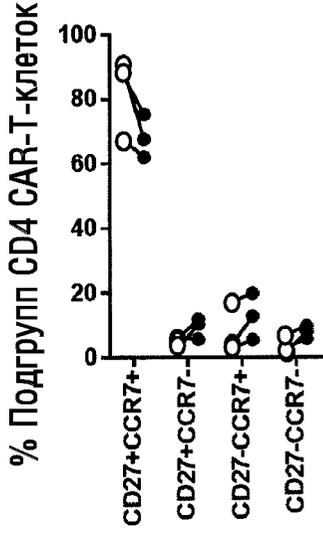
ФИГ.7В



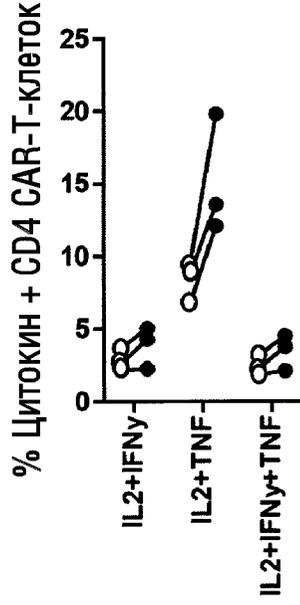
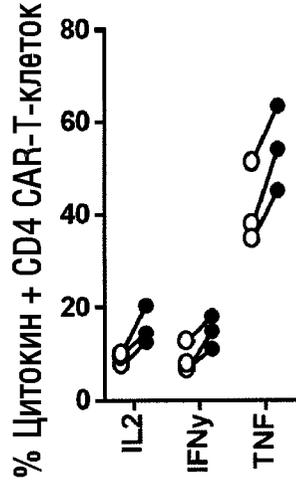
ФИГ.7С



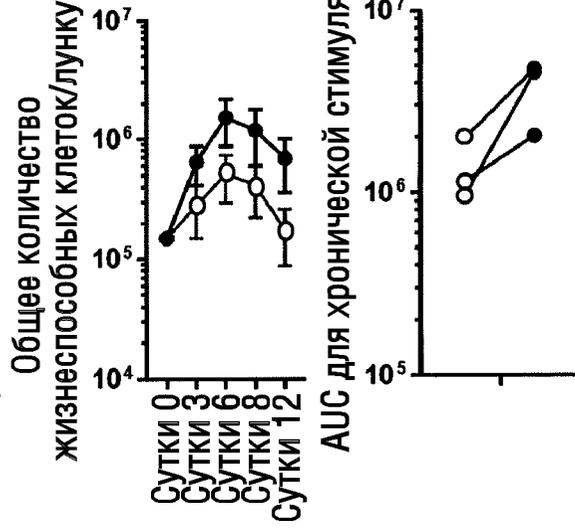
ФИГ.7D



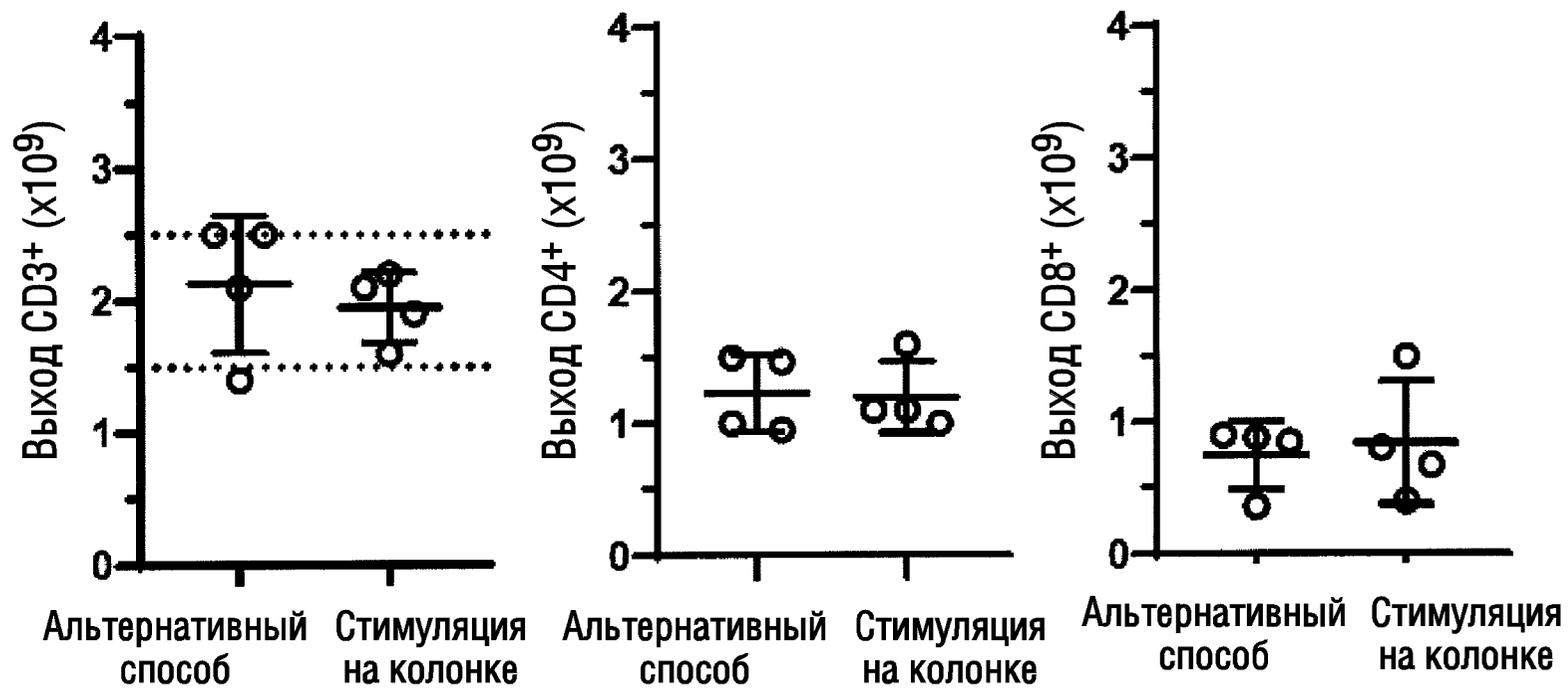
ФИГ.7Е



ФИГ.7F



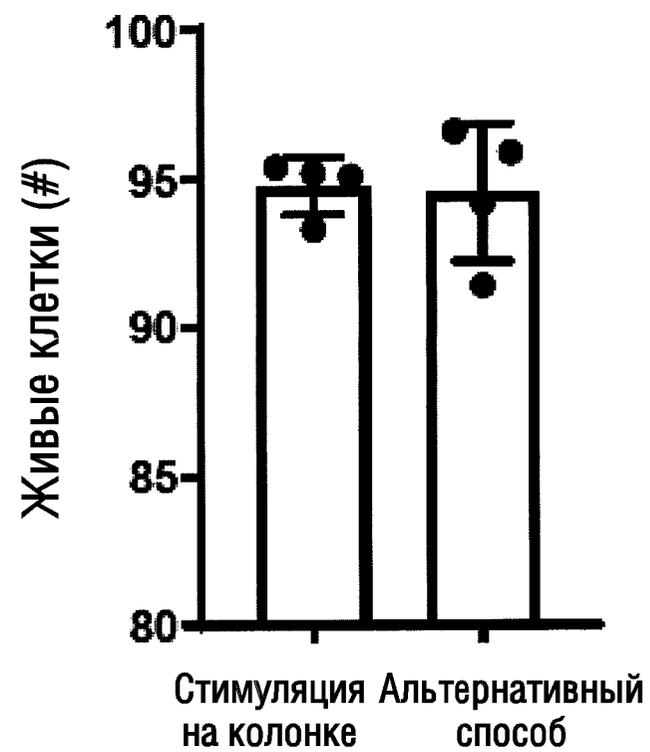
ФИГ.8А



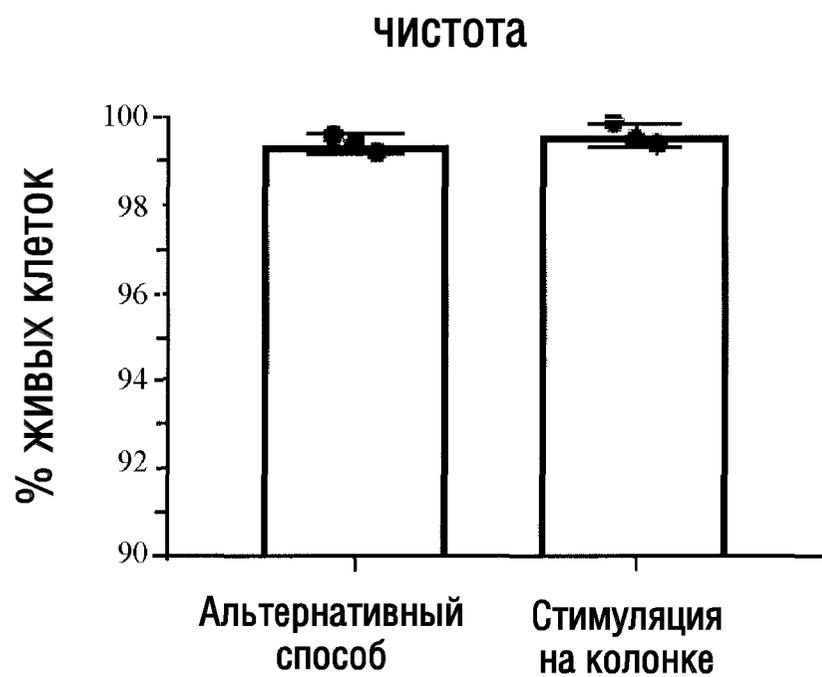
ФИГ.8В



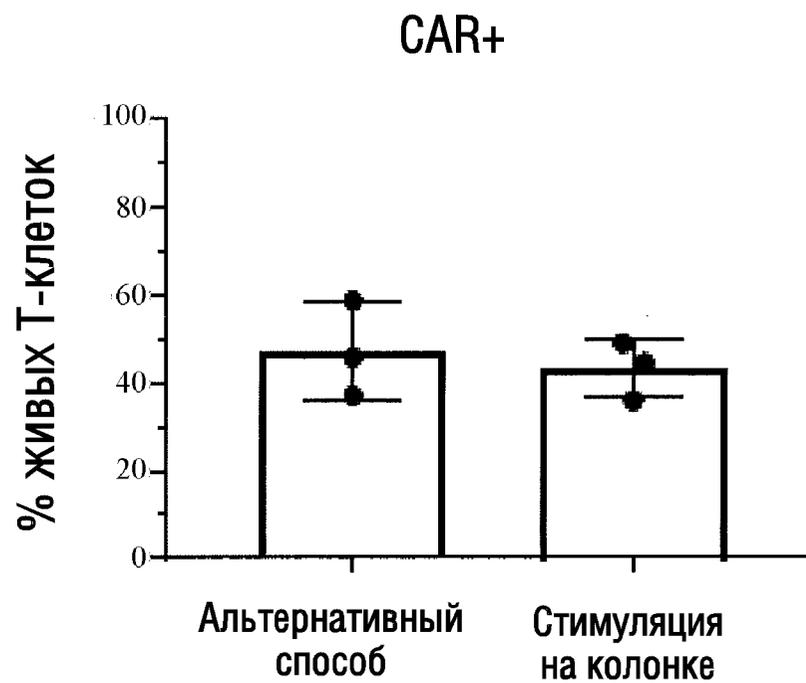
ФИГ.8С



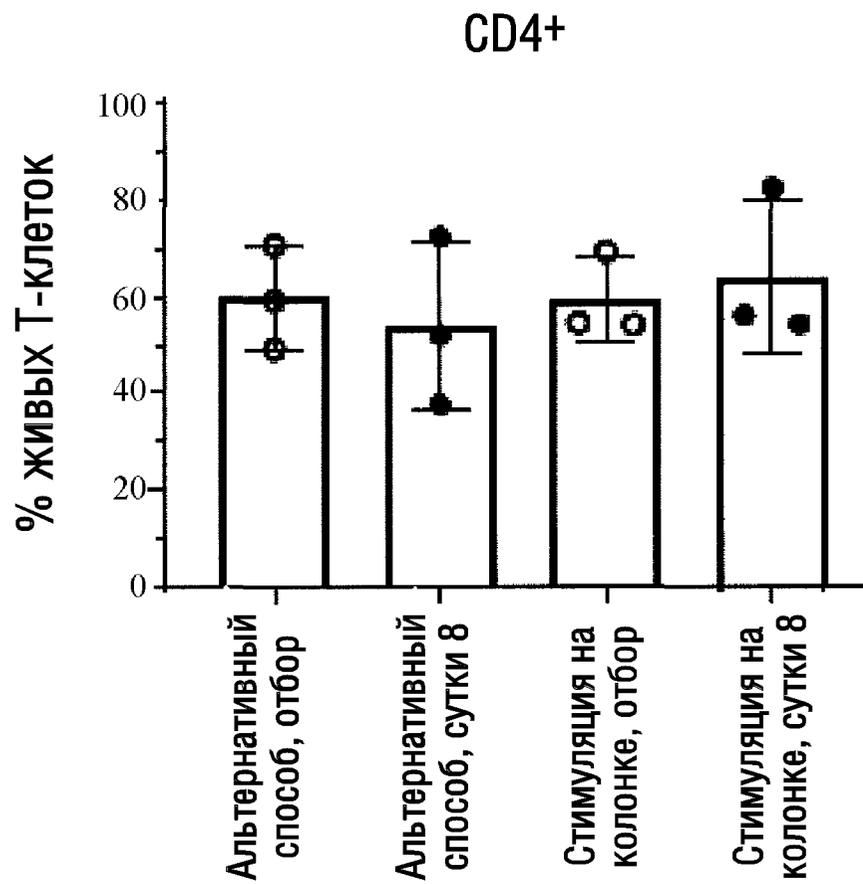
ФИГ.9А



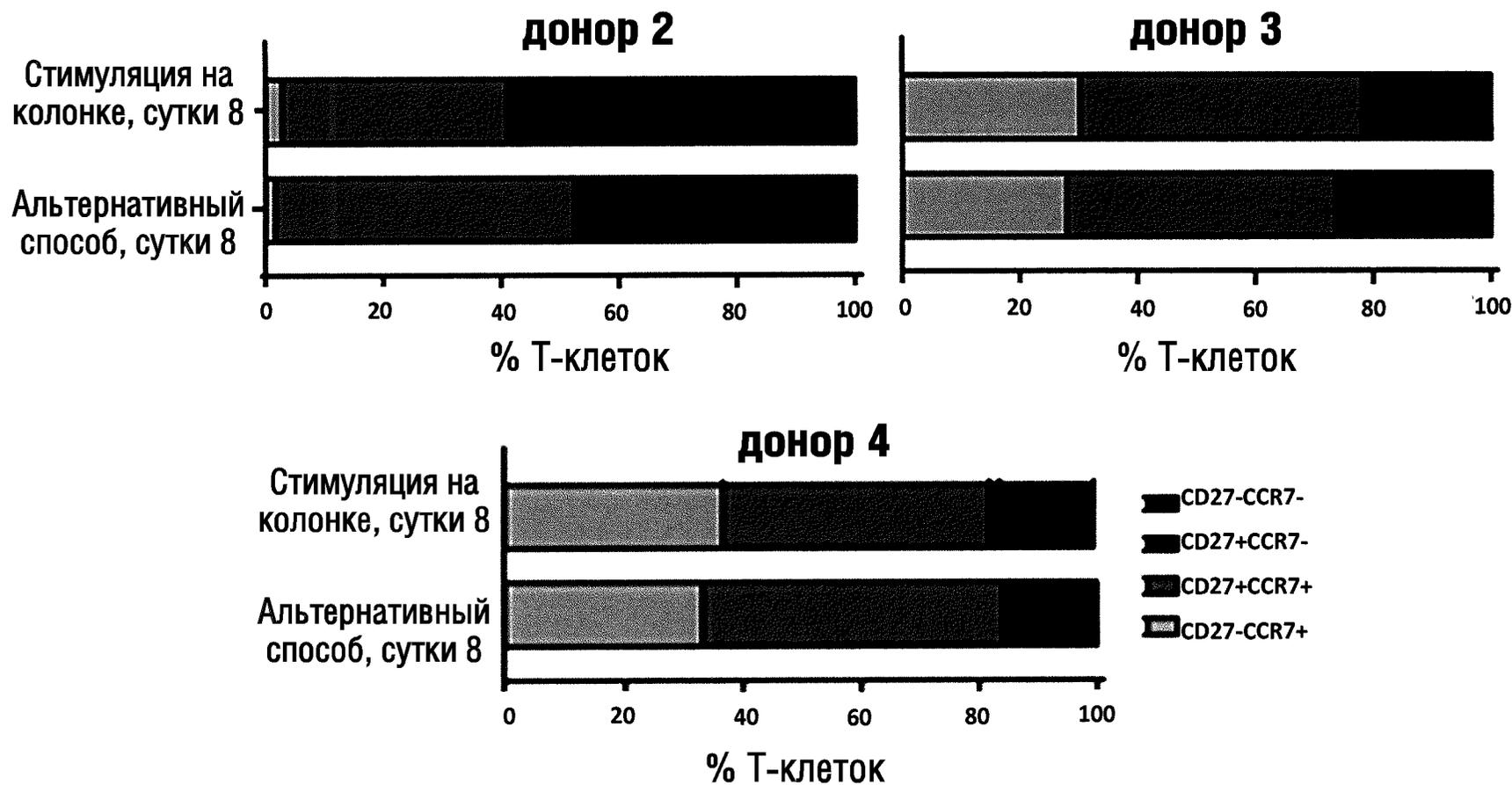
ФИГ.9В



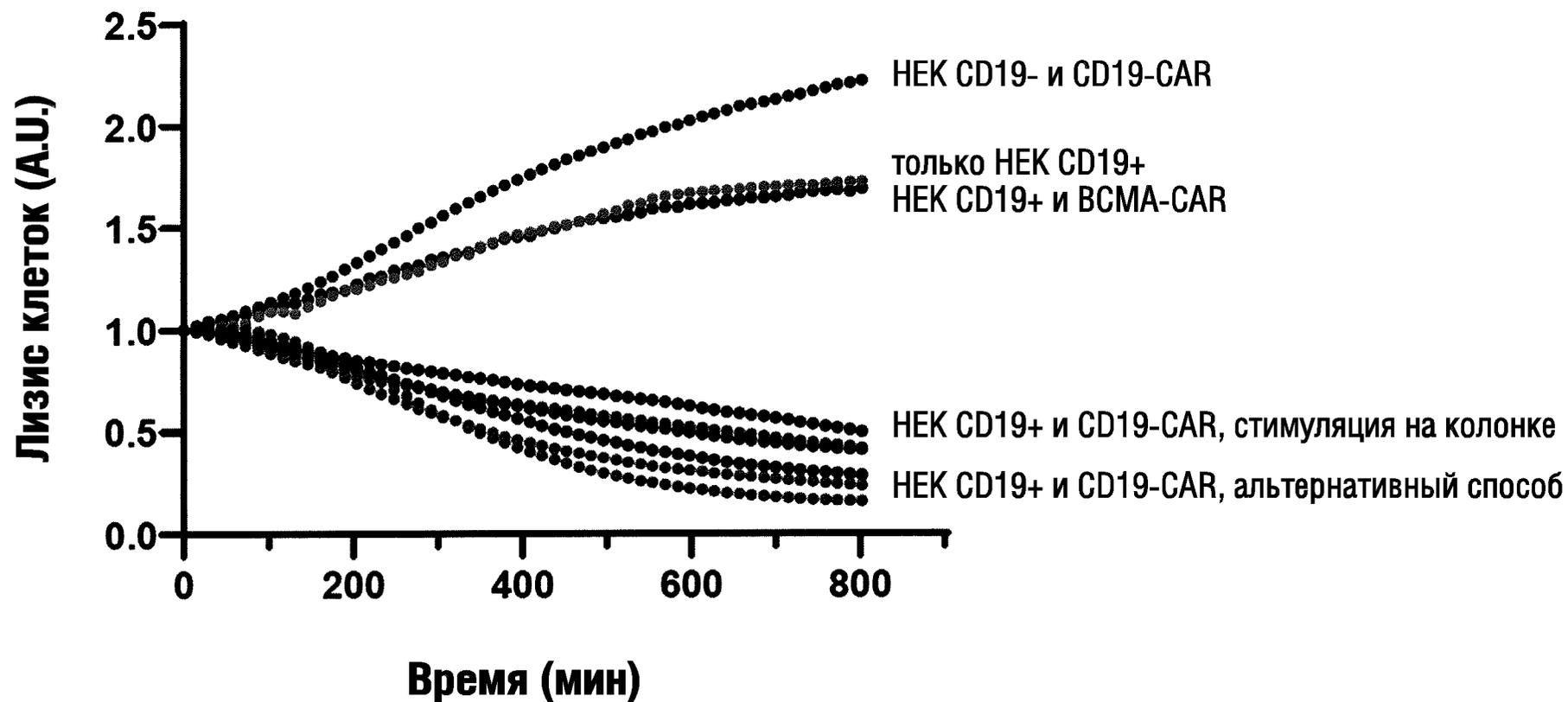
ФИГ.9С



ФИГ.9D

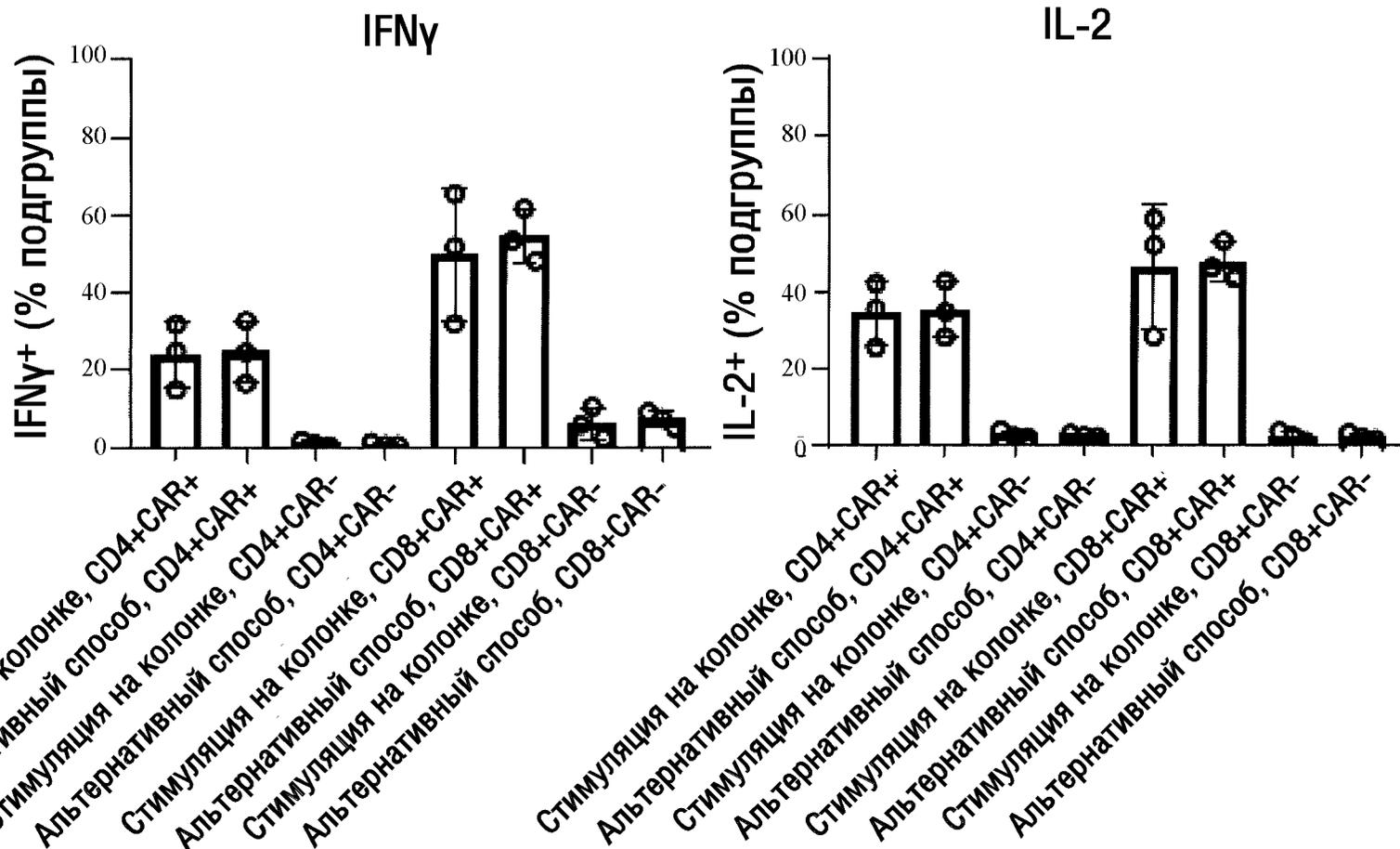


ФИГ.10

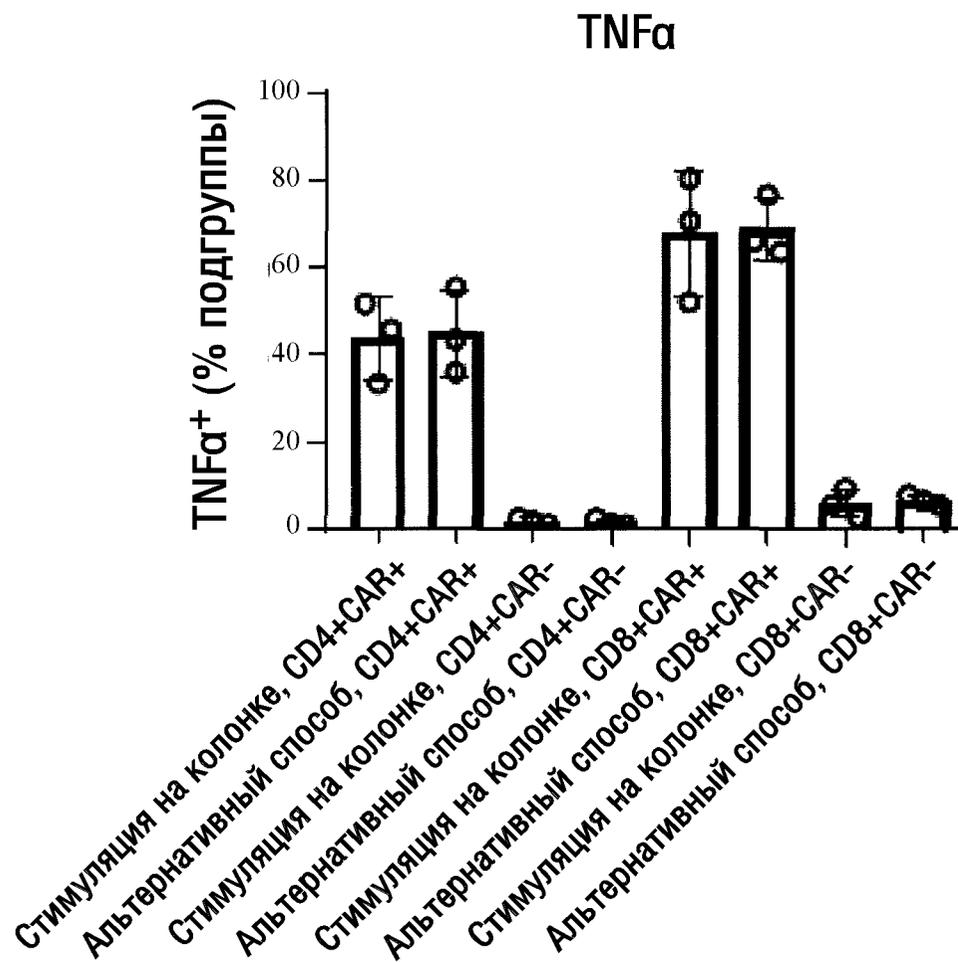


ФИГ.11А

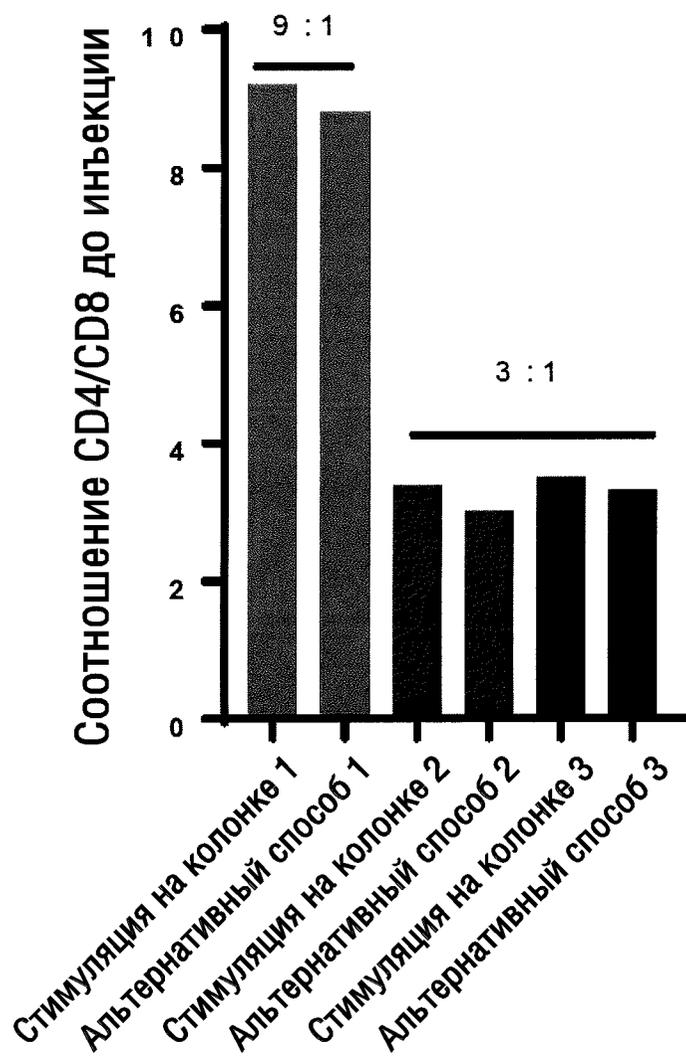
ФИГ.11В



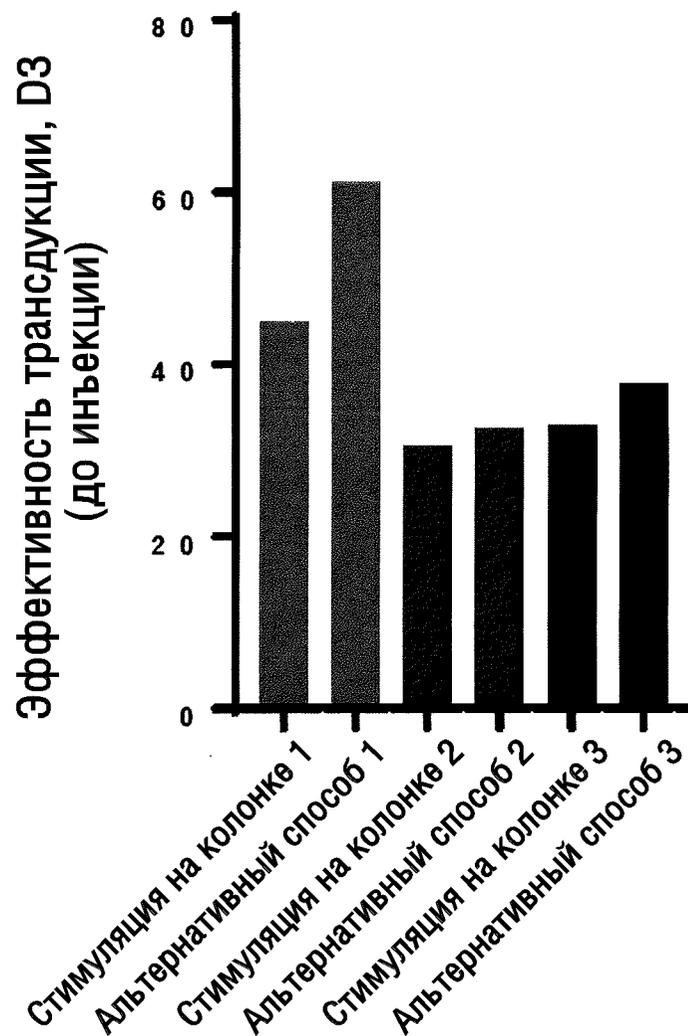
ФИГ.11С



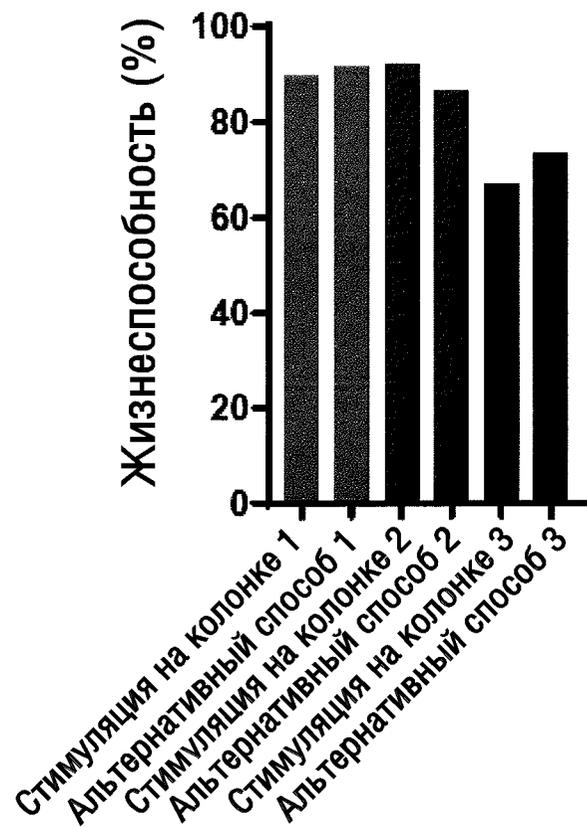
ФИГ.12А



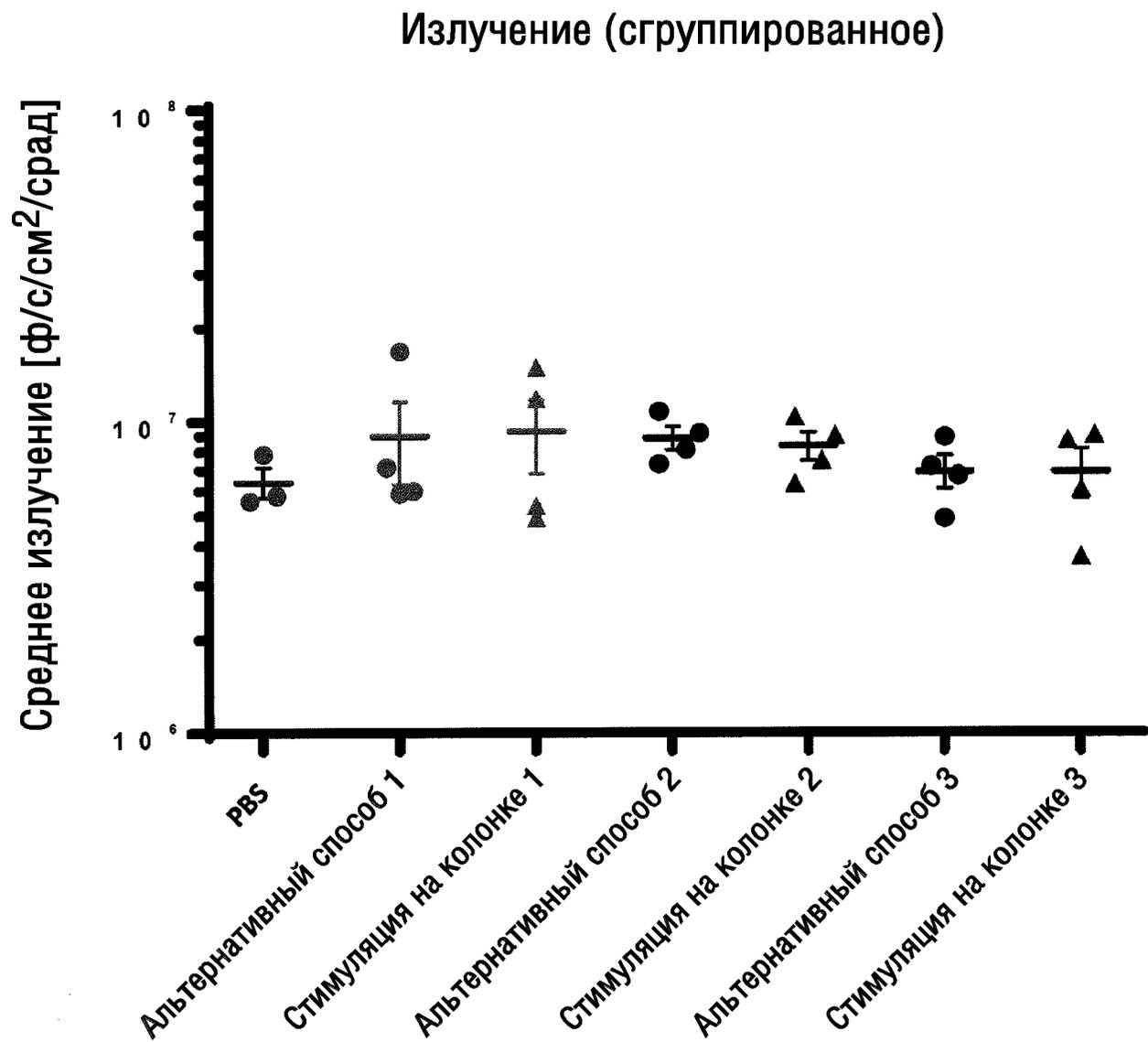
ФИГ.12В



ФИГ.12С



ФИГ.13



ФИГ.14

