(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202191248 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.09.08

(22) Дата подачи заявки
2019.11.05

(51) Int. Cl. ***A61P 35/00*** (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОК

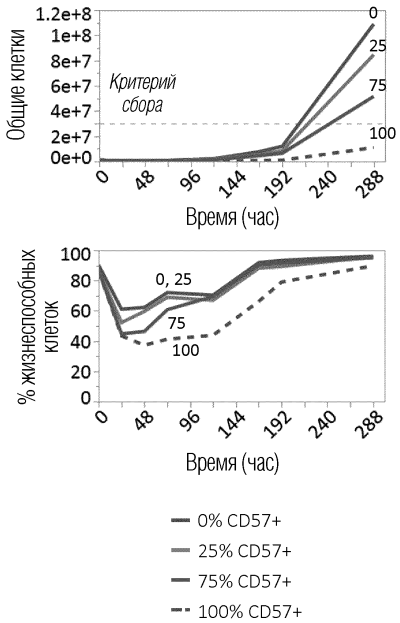
(31) **62/756,571; 62/798,457**
(32) **2018.11.06; 2019.01.29**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/059946**
(87) **WO 2020/097132 2020.05.14**

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

(72) Изобретатель:
Купер Сара, Коссетт Дэниел, Ларсон Райан, Теох Джеффри (US)

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

(57) Изобретение представляет клеточные популяции, обогащенные CD57 отрицательными Т-клетками или истощенные CD57 положительными клетками и способы стимулирования, культивирования, размножения и/или генетического конструирования клеточных популяций обогащенных CD57- Т-клеток или истощенных CD57+ Т-клеток. Также включены способы создания, выделения, обогащения или селектирования CD57- Т-клеток или истощения CD57+ клеток, например, отрицательным селектированием.



202191248 A1

202191248 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568519EA/022

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОК

Перекрестная ссылка на родственную заявку

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительных заявок США: 62/756,571, поданной 6 ноября 2018, озаглавленной “PROCESS FOR PRODUCING GENETICALLY ENGINEERED T CELLS”; и 62/798,457, поданной 29 января 2019, озаглавленной “PROCESS FOR PRODUCING GENETICALLY ENGINEERED T CELLS”, содержание которых включено в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

Включение в качестве ссылки списка последовательностей

Настоящая заявка подана со списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей представлен в виде файла, озаглавленного 735042017640SeqList.TXT, созданного 5 ноября 2019, который имеет размер 74 килобайта. Информация в электронном формате по списку последовательностей включена в качестве ссылки полностью.

Область техники

Настоящее изобретение относится в некоторых аспектах к клеточным популяциям, обогащенным CD57 отрицательными Т-клетками, или истощенными CD57 положительными клетками, и способам стимулирования, культивирования, размножения и/или генетического конструирования клеточных популяций, обогащенных CD57 отрицательными Т-клетками или истощенных CD57 положительными Т-клеткам. Также включены способы создания, выделения, обогащения или выбора CD57 отрицательных Т-клеток или истощения CD57 положительными клетками, например, отрицательной селектированием.

Уровень техники

Существуют различные способы клеточной терапии для лечения заболеваний и состояний. К способам клеточной терапии относятся способы, в которых используются иммунные клетки, такие как Т-клетки, генетически сконструированные с использованием рекомбинантного рецептора, такого как химерные антигенные рецепторы. Однако в некоторых случаях некоторые из существующих процессов могут дать популяцию с низкой консистентностью, эффективностью или жизнестойкостью in vivo. Необходимы улучшенные способы производства и/или конструирования таких клеточных терапий, в том числе для обеспечения улучшенного продукта клеточной терапии с высокой консистентностью, эффективностью и жизнестойкостью in vivo.

Сущность изобретения

В настоящем документе представлены способы обогащения Т-клеток, где способ включает проведение первого селектирования, первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец; и проведения второго

селектирования на клетках из истощенной популяции, где второе селектирование включает обогащение CD3+ Т-клетками из истощенной популяции, где обогащение тем самым создает обогащенную популяцию CD57-CD3+ Т-клеток.

Также в настоящем документе представлены способы обогащения Т-клеток, где способ включает проведение первого селектирования, первое селектирование включает обогащение CD3+ Т-клетками из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая обогащенную популяцию Т-клеток; и проведение второго селектирования на клетках из обогащенной популяции Т-клеток, где второе селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из обогащенного образца популяции клеток, тем самым создавая истощенную популяцию, где истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец и/или чем обогащенная популяция Т-клеток и обогащена CD3+ Т-клетками.

Также в настоящем документе представлены способы обогащения Т-клеток, где способ включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего продукт афереза или продукт лейкафереза, содержащий первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию Т-клеток, где истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец, и где истощенная популяция содержит, по меньшей мере, одно из следующих: (i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток; (ii) частоту CD57+ Т-клеток, которая составляет менее чем или примерно 35% от частоты CD57+ Т-клеток, присутствующих в биологическом образце; и (iii) CD3+ Т-клетки, где, по меньшей мере, 95% или примерно CD3+ Т-клеток являются CD57-.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция содержит, по меньшей мере, одно из следующих: (i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток; (ii) частоту CD57+ Т-клеток, которая составляет менее чем или примерно 35% от частоты CD57+ Т-клеток, присутствующих в биологическом образце; (iii) CD4+ Т-клетки, где, по меньшей мере, 95% или примерно CD4+ Т-клеток являются CD57-; и (iv) CD8+ Т-клетки, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD8+ Т-клеток являются CD57-. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD3+ Т-клеток истощенной популяции содержит CD57-CD3+ Т-клетки. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция является первой истощенной популяцией, и способ дополнительно включает обогащение CD3+ Т-клетками из первой истощенной популяции, тем самым создавая обогащенную популяцию CD57-CD3+ Т-клеток.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, биологический образец содержит продукт афереза или продукт лейкафереза.

Также в настоящем документе представлены способы обогащения Т-клеток, где способ включает проведение первого селектирования, где первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего продукт афереза или продукт лейкафереза, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым

создавая первую истощенную популяцию, где первая истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец; и (b) проведение второго селектирования на клетках из первой истощенной популяции, где второе селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из первой истощенной популяции, где обогащение тем самым создает обогащенную популяцию CD57-CD3+ Т-клеток.

Также в настоящем документе представлены способы обогащения Т-клеток, где способ включает (a) проведение первого селектирования, где первое селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из биологического образца, содержащего продукт афереза или продукт лейкафереза, содержащий первичные Т-клетки человека, тем самым создавая обогащенный биологический образец; и (b) проведение второго селектирования на клетках из обогащенного биологического образца, где второе селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из обогащенного биологического образца, тем самым создавая истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD3+ Т-клеток.

Также в настоящем документе представлены способы обогащения Т-клеток, где способ включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего продукт афереза или продукт лейкафереза, содержащий первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию Т-клеток, где истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец, и где истощенная популяция содержит: (i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток; (ii) частоту CD57+ Т-клеток, которая составляет менее чем или примерно 35% от частоты CD57+ Т-клеток, присутствующих в биологическом образце; (iii) CD4+ Т-клетки, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD4+ Т-клеток являются CD57-; и/или (iv) CD8+ Т-клетки, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD8+ Т-клеток являются CD57-.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция содержит CD57-CD4+ Т-клетки. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция содержит CD57- CD8+ Т-клетки. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция содержит CD57-CD4+ Т-клетки и CD57-CD8+ Т-клетки.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция является первой истощенной популяцией, и способ дополнительно включает селектирование CD4+ Т-клеток из первой истощенной популяции, тем самым создавая обогащенную вторую истощенную популяцию, обогащенную CD57-CD4+ Т-клетками и не селектированную популяцию. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, способ дополнительно включает селектирование CD8+ Т-клеток из не селектированной популяции, тем самым создавая третью истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD8+ Т-клеток, и вторую не селектированную популяцию.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция является первой истощенной популяцией, и способ дополнительно включает

селектирование CD8+ Т-клеток из первой истощенной популяции, тем самым создавая вторую истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD8+ Т-клеток, и не селектированную популяцию. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, способ дополнительно включает селектирование CD4+ Т-клеток из не селектированной популяции, тем самым создавая третью истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD4+ Т-клеток, и вторую не селектированную популяцию.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция является первой истощенной популяцией, и способ дополнительно содержит селектирование для CD3+ Т-клеток из первой истощенной популяции, тем самым создавая вторую истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD3+ Т-клеток, и не селектированную популяцию.

Также представлены способы обогащения Т-клеток, где способ включает: (a) проведение первого селектирования, где указанное первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего продукт афереза или продукт лейкафереза, содержащий первичные Т-клетки человека, тем самым создавая первую истощенную популяцию, где указанная первая истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец; (b) проведение второго селектирования на клетках из первой истощенной популяции, где указанное первое селектирование включает обогащение одних из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток из первой истощенной популяции, где обогащение тем самым создает вторую истощенную популяцию, обогащенную одними из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток, и не селектированную популяцию; и (c) проведение третьего селектирования, где третье селектирование включает обогащение другими из (i) CD4+ клеток и (ii) CD8+ клеток из не селектированной популяции, где обогащение тем самым создает третью истощенную популяцию, обогащенную другими из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, частота CD57+ клеток в истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) составляет менее чем или примерно 35%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% или 0,1% от частоты CD57+ Т-клеток в биологическом образце. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, частота CD57+ Т-клеток в истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) составляет менее чем или примерно 35%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% или 0,1% от частоты CD57+ Т-клеток в биологическом образце. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит менее чем или примерно 3%, менее чем или примерно 2%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция (необязательно первая истощенная

популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) не содержит или по существу не содержит CD57+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, истощенная популяция, которая по существу не содержит CD57+ Т-клетки, содержит менее чем примерно или примерно 3%, менее чем примерно или примерно 2%, менее чем примерно или примерно 1%, менее чем примерно или примерно 0,1% или менее чем примерно или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD4+ Т-клеток истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) содержит CD57-CD4+ Т-клетки. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD8+ Т-клеток истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) содержит CD57-CD8+ Т-клетки. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD4+ Т-клеток и 95% CD8+ Т-клеток истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) содержит CD57-CD4+ Т-клетки и CD57-CD8+ Т-клетки, соответственно.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, частота подобных наивным клеток в истощенной популяции (необязательно первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) на, по меньшей мере, или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше чем или примерно частота подобных наивным клеток в биологическом образце. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, частота одних или более из CD25+ Т-клеток, CD27+ Т-клеток, CD28+ Т-клеток, CCR7+ Т-клеток или CD45RA+ Т-клеток в истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) на, по меньшей мере, или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше чем или примерно частота соответствующих клеток в биологическом образце.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, точно или примерно 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 40% CD27+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 25%, 30%, 35% или 40% CD28+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 25%, 30%, 35% или 40% CD27+CD28+ Т-клеток. В некоторых из любых таких

вариантов осуществления, истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, точно или примерно 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20% или 25% CCR7+ Т-клеток.

В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, истощенную популяцию (необязательно, первую истощенную популяцию, вторую истощенную популяцию или третью истощенную популяцию) применяют как входную композицию для последующий стадий в процессе генетического конструирования Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, входная композиция включает CD57 истощенную популяцию, обогащенную CD4+ клетками (CD57-CD4+) и обогащенную CD8+ клетками (CD57-CD8+). В некоторых вариантах осуществления, входная композиция включает CD57 истощенную популяцию, обогащенную CD4+ Т-клетками (CD57-CD4+) и обогащенную CD8+ Т-клетками (CD57-CD8+). В некоторых вариантах осуществления любых из способов, способ включает объединение клеток второй истощенной популяции и третьей истощенной популяции, тем самым создавая входную композицию. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, способ дополнительно включает комбинирование второй истощенной популяции и третьей истощенной популяции. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, вторая истощенная популяция и третья истощенная популяция объединены в отношении от или примерно от 1:3 и или примерно 3:1, тем самым создавая истощенную популяцию, содержащую вторую истощенную популяцию и третью истощенную популяцию. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, вторая истощенная популяция и третья истощенная популяция объединены в отношении, точно или примерно 1:1, тем самым создавая истощенную популяцию, содержащую вторую истощенную популяцию и третью истощенную популяцию.

В некоторых из любых представленных способов, способ дает композицию Т-клеток, содержащую, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99%, или, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD57-CD4+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных способов, способ дает композицию Т-клеток, содержащую, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD57-CD8+ Т-

клеток. В некоторых из любых представленных способов, способ дает композицию Т-клеток, содержащую, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD57-CD3+ Т-клеток.

В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, отношение CD4+ к CD8+ Т-клеткам в композиции составляет от 3:1 до 1:3, все включительно. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, отношение CD4+ к CD8+ Т-клеткам в композиции составляет от 2:1 до 1:2, все включительно. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, отношение CD4+ к CD8+ Т-клеткам в композиции составляет от 1,5:1 до 1:1,5, все включительно. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, отношение CD4+ к CD8+ Т-клеткам в композиции составляет от 1,2:1 до 1:1,2, все включительно. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, отношение CD4+ к CD8+ Т-клеткам в композиции составляет или примерно составляет 1:1 CD4+. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, первичные Т-клетки получают от человека. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, первичные Т-клетки получают от субъекта с заболеванием или состоянием. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, заболеванием или состоянием является рак. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, первичные Т-клетки получают от здорового субъекта.

В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, удаление CD57+ Т-клеток включает селектирование на основе иммуноаффинности. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, селектирование на основе иммуноаффинности включает контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD57, и восстановление клеток, не связанных с антителом, тем самым проводя отрицательное селектирование, где восстановленные клетки истощают CD57+ клетками. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, обогащение клеток содержит селектирование на основе иммуноаффинности. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, первое, второе и/или третье селектирование обогащает CD4 или CD8 Т-клетками, и селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD4 или CD8, соответственно, и восстановление клеток, связанных с антителом, тем самым проводят положительное селектирование, где восстановленные клетки обогащены CD4+ клетками или CD8+ клетками. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, селектирование обогащает CD3 Т-клетками, и селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD3, и восстановлением клеток, связанных с антителом, тем самым проводят положительное селектирование, где восстановленные клетки обогащены CD3+ клетками. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления,

антитело иммобилизовано на твердое поверхности. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, твердой поверхностью является магнитная частица. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, антитело иммобилизовано на или присоединено к матрице для аффинной хроматографии.

В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, антитело дополнительно включает один или более партнеров связывания, способных образовывать обратимую связь сл связывающим реагентом, иммобилизованным на матрице, где антитело обратимо связано с указанной матрицей для хроматографии во время указанного контакта. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, связывающим реагентом является мутеин стрептавидина, который обратимо связывается с партнером связывания. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность lle44-Gly45-Ala46-Arg47 в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47 со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:66; 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: 66. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, партнером связывания является стрептавидин-связывающий пептид. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, стрептавидин-связывающий пептид выбирают из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 69), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)3-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:78), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:79), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)3-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 70), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)2-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 71) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)2Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 72). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, стрептавидин-связывающий пептид имеет последовательность SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:79). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, способ дополнительно включает, после контакта клеток в образце с матрицей для аффинной хроматографии, применение конкурирующий реагент для разрыва связи между партнером связывания и связывающим реагентом, тем самым восстанавливая клетки, связанные с антителом. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, конкурирующим реагентом является биотин или аналог биотина. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, матрица для хроматографии упакована в сепаратор, который является колонкой. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, биологический образец, содержащий первичные Т-клетки в образце, составленном с криопротектор. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления,

образцом афереза или лейкафереза является образец, составленный с криопротектором.

также представлены способы стимулирования Т-клеток, включая инкубирование Т-клеток входной композиции в условиях стимулирования, тем самым создавая стимулированную популяцию Т-клеток, где входная композиция содержит истощенную популяцию (необязательно, первую истощенную популяцию, вторую истощенную популяцию или третью истощенную популяцию), созданную любым способом, описанным в настоящем документе.

Также представлены способы стимулирования Т-клеток, где способ включает инкубирование Т-клеток входной композиции в условиях стимулирования, где доля CD57+ Т-клеток во входной композиции ниже пороговой доли CD57+ Т-клеток, где указанный порог составляет не более чем или примерно 30% CD57+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, пороговая доля составляет не более чем или примерно 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1% CD57+ Т-клеток.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция содержит: (i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток; (ii) по меньшей мере, точно или примерно 95% CD57- Т-клеток; (iii) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD4+ Т-клеток; (iv) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD8+ Т-клеток; и (v) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD3+ клеток.

Также в настоящем документе представлены способы для стимулирования Т-клеток, включающие инкубирование входной композиции Т-клеток в условиях стимулирования, тем самым создавая стимулированную популяцию Т-клеток, где входная композиция содержит, по меньшей мере, одно из следующих: (i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток; (ii) по меньшей мере, точно или примерно 95% CD57- Т-клеток; (iii) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD4+ Т-клеток; (iv) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD8+ Т-клеток; и (v) по меньшей мере, примерно или примерно 90% CD57-CD3+ Т-клеток.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция включает клетки, полученные из биологического образца, содержащего продукт афереза или продукт лейкафереза, содержащий первичные Т-клетки человека.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, способ дополнительно включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, тем самым создавая входную композицию, содержащую истощенную популяцию Т-клеток.

Также представлены способы стимулирования Т-клеток, где способ включает: (a) проведение первого селектирования, где указанное первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая первую истощенную популяцию, где указанная первая истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец; (b) проведение второго селектирования на клетках из первой истощенной популяции, где указанное первое селектирование включает обогащение одних из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток из первой истощенной популяции, где обогащение тем самым создает

вторую истощенную популяцию, обогащенную одними из (i) CD57-CD4+ Т-клеток и (ii) CD57-CD8+ Т-клеток, и не селектированную популяцию; (c) проведение третьего селектирования на клетках из не селектированной популяции, где третье селектирование включает обогащение другими из (i) CD4+ клеток и (ii) CD8+ клеток из не селектированной популяции, где обогащение тем самым создает третью истощенную популяцию, обогащенную другими из (i) CD57-CD4+ Т-клеток и (ii) CD57-CD8+ Т-клеток; и (d) инкубирование одной или более сходных композиций в условиях стимулирования, где указанная одна или более входных композиций содержат Т-клетки из второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, стадия (d) включает инкубирование входной композиции, содержащей CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки из второй и третьей истощенных популяций. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, стадия (d) включает отдельное инкубирование первой входной композиции и второй входной композиции, где указанная первая входная композиция содержит Т-клетки из второй истощенной популяции, и указанная вторая входная композиция содержит Т-клетки из третьей истощенная популяция.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, второе селектирование включает обогащение (i) CD4+ Т-клетками, тем самым создавая первую обогащенную популяцию, обогащенную (i) CD57-CD4+ Т-клетками, и где первая входная композиция содержит обогащенные CD57-CD4+ Т-клетки; и третье селектирование включает обогащение (ii) CD8+ Т-клетками, тем самым создавая вторую обогащенную популяцию, обогащенную (ii) CD57-CD8+ Т-клетками, и где вторая входная композиция содержит обогащенные CD57-CD8+ Т-клетки. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, второе селектирование включает обогащение (ii) CD8+ Т-клеток, тем самым создавая первую обогащенную популяцию, обогащенную (ii) CD57-CD8+ Т-клетками, и где первая входная композиция содержит обогащенные CD57-CD8+ Т-клетки; и третье селектирование включает обогащение (i) CD4+ Т-клеток, тем самым создавая вторую обогащенную популяцию, обогащенную (i) CD57-CD4+ Т-клетками, и где вторая входная композиция содержит CD57-CD4+ Т-клетки. Также в настоящем документе представлены способы стимулирования Т-клеток, где способ включает (a) проведение первого селектирования, где первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая первую истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец; (b) проведение второго селектирования на клетках из первой истощенной популяции, где указанное второе селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из первой истощенной популяции, где обогащение тем самым создает вторую истощенную популяцию, обогащенную CD3+ Т-клетками; и (c) инкубирование одной или более входных композиций в условиях стимулирования, где одна или более входных композиций содержит Т-клетки из второй истощенной популяции.

Также в настоящем документе представлены способы стимулирования Т-клеток, где способ включает (a) проведение первого селектирования на клетках из биологического образца, первое селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из биологического образца, где обогащение тем самым создает обогащенный биологический образец, обогащенный CD3+ Т-клетками; (b) проведение второго селектирования, где второе селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из обогащенного биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где истощенная популяция содержит меньше CD57+ клеток, чем обогащенный биологический образец; и (c) инкубирование одной или более входных композиций в условиях стимулирования, одна или более входных композиций содержат Т-клетки из истощенной популяции.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция содержит менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция содержит менее чем или примерно 3%, менее чем или примерно 2%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, частота CD57+ клеток во входной композиции составляет менее чем или примерно 35%, 30%, 25%, 20%, 10%, 5%, 1% или 0,1% от частоты CD57+ Т-клеток, присутствующих в биологическом образце. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, частота CD57+ Т-клеток во входной композиции составляет менее чем или примерно 35%, 30%, 25%, 20%, 10%, 5%, 1% или 0,1% от частоты CD57+ Т-клеток, присутствующих в биологическом образце. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция не содержит или по существу не содержит CD57+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, истощенная популяция, которая по существу не содержит CD57+ Т-клетки, содержит менее чем примерно или примерно 3%, менее чем примерно или примерно 2%, менее чем примерно или примерно 1%, менее чем примерно или примерно 0,1% или менее чем примерно или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD57- Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99%, или, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD57-CD4+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD57-CD8+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, CD57- Т-клетки включают CD57-CD4+ Т-клетки и CD57-CD8+ Т-клетки. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция содержит

отношение от 3:1 до 1:3, 2:1 и 1:2, 1,5:1 и 1:1,5 или 1,2:1 и 1:1,2 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам, включительно. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция содержит отношение 1:1 или примерно CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, частота подобных наивным клеток во входной композиции составляет, по меньшей мере, на или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше чем точно или примерно от частоты подобных наивным клеток в биологическом образце. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, частота одних или более из CD25+ Т-клеток, CD27+ Т-клеток, CD28+ Т-клеток, CCR7+ Т-клеток или CD45RA+ Т-клеток во входной композиции составляет на, по меньшей мере, или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше чем точно или примерно от частоты соответствующих клеток в биологическом образце.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 40% CD27+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 25%, 30%, 35% или 40% CD28+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20% или 25% CCR7+ Т-клеток.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца и/или обогащение клеток при первом и/или втором селектировании включает селектирование на основе иммуноаффинности. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD57, CD4 или CD8, и восстановлением клеток, не связанных с антителом, тем самым проводя отрицательное селектирование или восстановление клеток, связанных с антителом, тем самым осуществляя положительное селектирование, где восстановленные клетки истощены CD57+ клетками и/или обогащены CD4+ клетками или CD8+ клетками, и антитело иммобилизовано на магнитной частице. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, иммобилизованном на или присоединенным к матрице для аффинной хроматографии, где указанное антитело способно специфически связываться с CD57, CD4 или CD8 для осуществления отрицательного селектирования CD57+ клеток или положительного селектирования CD4+ или CD8+ клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD57, CD4 или CD8, и восстановление клеток, не связанных с антителом, тем самым проводя

отрицательное селектирование или восстановление клеток, связанных с антителом, тем самым осуществляя положительное селектирование, где восстановленные клетки истощены CD57+ Т-клетками и/или обогащены CD4+ Т-клетками или CD8+ Т-клетками, и антитело иммобилизовано на магнитной частице. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, иммобилизованном на или присоединенным к матрице для аффинной хроматографии, где указанное антитело способно специфически связываться с CD57, CD4 или CD8 для осуществления отрицательного селектирования CD57+ Т-клеток или положительного селектирования CD4+ или CD8+ Т-клеток.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, где указанный стимулирующий реагент способен активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса, и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, стимулирующий реагент содержит (i) первичный агент, который специфически связывается с членом TCR комплекса, необязательно, который специфически связывается с CD3, и (ii) вторичный агент, который специфически связывается с костимулирующей молекулой Т-клетки, необязательно, где костимулирующую молекулу выбирают из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, один или оба из первичных и вторичных агентов включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, первичные и вторичные агенты включают антитело, необязательно, где стимулирующий реагент включает инкубирование с анти-CD3 антителом с анти-CD28 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, первичным агентом является анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и вторичным агентом является анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, антигенсвязывающим фрагментом является одновалентный фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fab фрагмента, Fv фрагмента и одноцепочечного Fv фрагмента (scFv). В некоторых из любых таких вариантов осуществления, первичным агентом является анти-CD3 Fab, и вторичный агент содержит анти-CD28 Fab. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, первичный агент и вторичный агент присутствуют или присоединены на поверхности твердой подложки. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, твердой подложкой является или содержит гранулу, необязательно, парамагнитную гранулу. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, твердой подложкой является парамагнитная гранула с присоединенным на поверхности анти-CD3 и анти-CD28 антителами, и стимулирующий реагент присутствует в отношении менее чем примерно или примерно 3:1 гранул к клеткам.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, содержащего парамагнитную гранулу с присоединенными на поверхности анти-CD3 и анти-CD28 антителами, где указанный стимулирующий реагент присутствует в отношении менее чем или примерно 3:1 гранул к клеткам. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, указанный стимулирующий реагент присутствует в отношении, равном или около 1:1 гранул к клеткам.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, способ дополнительно включает отделение стимулирующего реагента от клеток, где указанное отделение включает обработку клеток магнитным полем.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, первичный агент и вторичный агент обратимо связаны на поверхности реагента из олигомерных частиц, содержащего множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина связываются с или способны связываться с биотином, авидином, аналогом биотина или мутеина, аналогом авидина или мутеина, и/или его биологически активным фрагментом. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, молекулы мутеина стрептавидина включают аминокислотную последовательность Val^{44}-Thr^{45}-Ala^{46}-Arg^{47} или Ile^{44}-Gly^{45}-Ala^{46}-Arg^{47} в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47 со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 66. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, молекулы мутеина стрептавидина содержат: a) последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NOS: 66-68, 73, 80-82 или 85-88; b) последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, точно или примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к любой из SEQ ID NOs: 70-73, 78, и 85-89, и содержит аминокислотную последовательность с, соответствующую Val^{44}-Thr^{45}-Ala^{46}-Arg^{47} или Ile^{44}-Gly^{45}-Ala^{46}-Arg^{47} и/или обратимо связывающуюся с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом; или c) функциональный фрагмент a) или b), который обратимо связывается с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, молекулы мутеина стрептавидина содержат последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 73 или 78. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, молекулы мутеина стрептавидина содержат последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 73. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, молекулы мутеина стрептавидина содержат последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 78. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, первичный агент и вторичный агент каждый содержит стрептавидин-связывающий пептид. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, стрептавидин-связывающий пептид выбирают из группы, состоящей из

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 69), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-$(GlyGlyGlySer)_3$-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 76), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-$(GlyGlyGlySer)_2$-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 77) 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: 89). В некоторых из любых таких вариантов осуществления, стрептавидин-связывающий пептид выбирают из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 69), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-$(GlyGlyGlySer)_3$-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 70), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-$(GlyGlyGlySer)_2$-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 71) 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: 89). В некоторых из любых таких вариантов осуществления, первичный агент включает анти-CD3 Fab, и вторичный агент содержит анти-CD28 Fab.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, реагент из олигомерных частиц имеет радиус больше чем или примерно 60 нм, больше чем или примерно 70 нм, больше чем или примерно 80 нм или больше чем или примерно 90 нм. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, реагент из олигомерных частиц имеет молекулярную массу: по меньшей мере, точно или примерно 5×10^7 г/моль или, по меньшей мере, точно или примерно 1×10^8 г/моль; и/или от 5×10^7 г/моль до 5×10^8 г/моль, от 1×10^8 г/моль до 5×10^8 г/моль или от 1×10^8 г/моль до 2×10^8 г/моль. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, реагент из олигомерных частиц содержит, по меньшей мере, точно или примерно 500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере, точно или примерно 1000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере, точно или примерно 1500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина или, по меньшей мере, точно или примерно 2000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина; и/или; от 1000 до 20000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, от 1000 до 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина или от 2000 до 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, способ дополнительно включает отделение стимулирующего реагента от клеток, где указанное отделение включает контакт вещества с клетками, где указанное вещество способно обратимо связывать первичный и вторичный агент и реагент из олигомерных частиц.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, веществом является свободный партнер связывания и/или является конкурирующий агент. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, присутствие вещества останавливает или уменьшает сигнал, индуцированный или модулированный первичным и вторичным агентом в Т-клетке. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, вещество является или включает стрептавидин-связывающмй пептид, биотин или биологическая активный фрагмент или аналог биотина или биологически активного фрагмента. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, вещество является или включает

аналог биотина. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, вещество является или включает стрептавидин-связывающий пептид, и стрептавидин-связывающий пептид выбирают из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 69), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-$(GlyGlyGlySer)_3$-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 70), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-$(GlyGlyGlySer)_2$-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 77, например, SEQ ID NO:71) 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: 89, также указанный в SEQ ID NO:72). В некоторых из любых таких вариантов осуществления, вещество является или включает биотин или биологические активный фрагмент или аналог биотина или биологические активного фрагмента.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, условия стимулирования включают присутствие одного или более рекомбинантных цитокинов. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, условия стимулирования включают присутствие одного или более рекомбинантных IL-2, IL-7 и IL-15.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, способ дополнительно включает введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор в популяции Т-клеток, полученной из истощенной популяции или входной композиции или стимулированной популяции, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток.

Также представлены способы генетического конструирования Т-клеток, где способ включает введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в стимулированную популяцию Т-клеток, созданную инкубированием входной композиции Т-клеток в условиях стимулирования, если доля CD57+ Т-клеток во входной композиции находится ниже пороговой доли CD57+ Т-клеток, где порог составляет не более чем точно или примерно 30%. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, порог составляет не более чем точно или примерно 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1%.

Также представлены способы генетического конструирования Т-клеток, где способ включает введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в популяцию Т-клеток из композиции Т-клеток, полученный способом из любых из способов в настоящем документе, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток. Также представлены способы генетического конструирования Т-клеток, где способ включает введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор в популяцию Т-клеток из любой из стимулированных популяций Т-клеток, представленных в настоящем документе, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток.

Также представлены способы генетического конструирования Т-клеток, включающие введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в Т-клетку из входной композиции, где входная композиция содержит одно или более из: (i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток; (ii) по меньшей мере, точно или

примерно 95% CD57- Т-клеток; (iii) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD4+ Т-клеток; или (iv) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD8+ Т-клеток.

Также представлены способы генетического конструирования Т-клеток, где способ включает: (a) проведение первого селектирования, где указанное первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец; (b) проведение второго селектирования на клетках из истощенной популяции, где указанное первое селектирование включает обогащение одних из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, где обогащение тем самым создает первую обогащенную популяцию, обогащенную одними из (i) CD57-CD4+ Т-клеток и (ii) CD57-CD8+ Т-клеток, и не селектированную популяцию; и (c) проведение третьего селектирования на клетках из не селектированной популяции, где третье селектирование включает обогащение другими из (i) CD4+ клеток и (ii) CD8+ клеток из не селектированной популяции, где обогащение тем самым создает вторую обогащенную популяцию, обогащенную другими из (i) CD57-CD4+ Т-клеток и (ii) CD57-CD8+ Т-клеток; (d) введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в Т-клетку из одной или обеих первой и второй обогащенных популяций, тем самым создавая первую и вторую сконструированную популяцию Т-клеток.

Также представлены способы генетического конструирования Т-клеток, где способ включает проведение первого селектирования, где первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец; проведение второго селектирования на клетках из истощенной популяции, второе селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, где обогащение тем самым создает первую обогащенную популяцию, обогащенную CD57-CD3+ Т-клетками; и введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в Т-клетки из первой обогащенной популяции, тем самым создавая первую сконструированную популяцию Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, до введения, первую обогащенную популяцию ингибируют в условиях стимулирования.

Также в настоящем документе представлены способы генетического конструирования Т-клеток, где способ включает проведение первого селектирования, первое селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, где обогащение тем самым создает обогащенный биологический образец, обогащенный CD3+ Т-клетками; проведение второго селектирования на клетках из обогащенного биологического образца, второе селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из обогащенного биологического

образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем обогащенный биологический образец; и введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в Т-клетки из истощенной популяции, тем самым создавая первую сконструированную популяцию Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, до введения, истощенную популяцию инкубируют в условиях стимулирования.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, до введения, входную композицию или обогащенные популяции инкубируют в условиях стимулирования.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, стадия (d) включает введение гетерологичного полинуклеотида в популяцию клеток, содержащую CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки из первой и второй обогащенных популяций. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, стадия (d) включает отдельное введение гетерологичного полинуклеотида в клетки первой обогащенной популяции и клетки второй обогащенной популяции.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, второе селектирование включает обогащение (i) CD4+ Т-клеток, тем самым создавая первую обогащенную популяцию, обогащенную (i) CD57-CD4+ Т-клетками, и где первая сконструированная популяция содержит CD57-CD4+ Т-клетки; и третье селектирование включает обогащение (ii) CD8+ Т-клеток, тем самым создавая вторую обогащенную популяцию, обогащенную (ii) CD57-CD8+ Т-клетками, и где вторая сконструированная популяция содержит CD57-CD8+ Т-клетки. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, второе селектирование включает обогащение (ii) CD8+ Т-клеток, тем самым создавая первую обогащенную популяцию, обогащенную (ii) CD57-CD8+ Т-клетками, и где первая сконструированная популяция содержит CD57-CD8+ Т-клетки; и третье селектирование включает обогащение (i) CD4+ Т-клетками, тем самым создавая вторую сконструированную популяцию, обогащенную (i) CD57-CD4+ Т-клетками, и где вторая входная популяция содержит CD57-CD4+ Т-клетки.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, до введения, клетки одной или обеих первой и второй обогащенных популяциях инкубируют в условиях стимулирования. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, введение включает трансдукцию вирусным вектором, содержащим гетерологичный полинуклеотид. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, вирусным вектором является гаммаретровирусный вектор или лентивирусный вектор. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, вирусным вектором является лентивирусный вектор.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, способ дополнительно включает инкубирование композиции, содержащей трансдуцированные клетки вплоть до 96 часов после введения. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, инкубирование происходит при температуре точно или примерно 37°±2°C. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, инкубирование проводят в течение вплоть до

72 часов после введения. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, инкубирование проводят в течение вплоть до 48 часов после введения. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, инкубирование проводят в течение вплоть до 24 часов после введения. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, инкубирование дает интеграцию вирусного вектора в геном Т-клетки.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, способ необязательно дополнительно включает культивирование клеток трансформированной популяции в условиях, способствующих пролиферации или размножению сконструированных клеток, тем самым создавая размноженную популяцию клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, культивирование проводят в присутствии одного или более рекомбинантных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, одним или более рекомбинантными цитокинами является один или более IL-2, IL-7 и IL-15. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, пролиферация или размножение дает, примерно или, по меньшей мере, точно или примерно 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, или больше чем или примерно 5-кратное повышение количества жизнеспособных Т-клеток, содержащих гетерологичный полинуклеотид.

Также представлены способы сбора или получения клеток, где способ включает сбор или получение популяции клеток, произведенных любым способом, описанным в настоящем документе.

Также представлены способы генетического конструирования Т-клеток, где способ включает: (a) инкубирование Т-клеток из истощенной популяции, созданной любым способом, описанным в настоящем документе в условиях стимулирования, где указанные условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса, и одного или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, тем самым, создавая стимулированные Т-клетки; и (b) введение гетерологичного полинуклеотида в стимулированные Т-клетки, где указанное введение включает трансдуцирование стимулированных Т-клеток вирусным вектором, содержащим гетерологичный полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток.

Также представлены способы генетического конструирования Т-клеток, где способ включает: (a) проведение первого селектирования, где указанное первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток чем биологический образец; (b) проведение второго селектирования на клетках из истощенной популяции, где указанное первое селектирование включает обогащение одних из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, где обогащение тем самым создает первую обогащенную популяцию, обогащенную одними из (i) CD57-CD4+ Т-клеток и (ii) CD57-CD8+ Т-клеток, и не селектированную популяцию;

и (c) проведение третьего селектирования на клетках из не селектированной популяции, где третье селектирование включает обогащение другими из (i) CD4+ клеток и (ii) CD8+ клеток из не селектированной популяции, где обогащение тем самым создает вторую обогащенную популяцию, обогащенную другими из (i) CD57-CD4+ Т-клетками и (ii) CD57-CD8+ Т-клетками; (d) инкубирование Т-клеток из первой обогащенной популяции и второй обогащенной популяции в условиях стимулирования, где указанные условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, тем самым создавая стимулированные Т-клетки первой и второй обогащенной популяций; и (e) введение гетерологичного полинуклеотида в стимулированные Т-клетки первой и второй обогащенных популяций, где указанное введение включает трансдуцирование стимулированных Т-клеток вирусным вектором, содержащим гетерологичный полинуклеотид, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток из первой и второй обогащенных популяций.

Также в настоящем документе представлены способы генетического конструирования Т-клеток, где способ включает проведение первого селектирования, где указанное первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец; проведение второго селектирования на клетках из истощенной популяции, где указанное второе селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, где обогащение тем самым создает обогащенную популяцию, обогащенную CD57-CD3+ Т-клетками; инкубирование Т-клеток из обогащенной популяции в условиях стимулирования, где условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, тем самым создавая стимулированные Т-клетки обогащенной популяции; и введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в стимулированные Т-клетки обогащенной популяции, где указанное введение включает трансдуцирование стимулированных Т-клеток вирусным вектором, содержащим гетерологичный полинуклеотид, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток из обогащенной популяции.

Также в настоящем документе представлены способы генетического конструирования Т-клеток, где способ включает проведение первого селектирования, первое селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, где обогащение тем самым создает обогащенный биологический образец, обогащенный CD3+ Т-клетками; проведение второго селектирования на клетках из обогащенного биологического образца, где второе

селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из обогащенного биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем обогащенный биологический образец; инкубирование Т-клеток из истощенной популяции в условиях стимулирования, где условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, тем самым создавая стимулированные Т-клетки истощенной популяции; и (d) введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор в стимулированные Т-клетки истощенной популяции, где указанное введение включает трансдуцирование стимулированных Т-клеток вирусным вектором, содержащим гетерологичный полинуклеотид, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток из истощенной популяции.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, способ дополнительно включает:(i) культивирование популяций сконструированных Т-клеток в условиях, способствующих пролиферации или размножению сконструированной популяции, тем самым создавая размноженную популяцию Т-клеток; и (ii) сбор или получение размноженной популяции.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, до инкубирования, первая обогащенная популяция и вторая обогащенная популяция содержит одно или более из: (i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток; (ii) частоту CD57+ Т-клеток, которая составляет менее чем или примерно 35% от частоты CD57+ Т-клеток присутствующих в биологическом образце; или (iii) по меньшей мере, точно или примерно 95% CD57- Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, до инкубирования, первая обогащенная популяция и вторая обогащенная популяция содержит менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, до инкубирования, первая обогащенная популяция и вторая обогащенная популяция каждая содержит менее чем или примерно 3%, менее чем или примерно 2%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0.1% или менее чем или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, до инкубирования, частота CD57+ клеток в первой обогащенной популяции и второй обогащенной популяции составляет менее чем или примерно 35%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% или 0,1% от частоты CD57+ Т-клеток в биологическом образце. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, до введения, первая обогащенная популяция и вторая обогащенная популяция не содержит или по существу не содержат CD57+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, истощенная популяция, которая по существу не содержит CD57+ Т-клетки, содержит менее чем примерно или примерно 3%, менее чем примерно или примерно 2%, менее чем примерно или примерно 1%, менее чем примерно или примерно 0,1% или менее чем примерно или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, клетки первой обогащенной композиции и второй композиции инкубируют и/или культивируют вместе в одной смешанной популяции. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, до введения, одна смешанная популяция включает отношение от 3:1 и 1:3, 2:1 и 1:2, 1,5:1 и 1:1,5 или 1,2:1 и 1:1,2 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам, включительно. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, до введения, одна смешанная популяция включает отношение, составляющее или составляющее примерно 1:1 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, клетки первой обогащенной популяции и второй обогащенной популяции инкубируют и/или культивируют по отдельности.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, стимулирующий реагент включает парамагнитную гранулу с присоединенными на поверхности анти-CD3 и анти-CD28 антителами. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, стимулирующий реагент включает реагент из олигомерных частиц, содержащих множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с обратимо связанными анти-CD3 и анти-CD28 Fab.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца и/или обогащение клеток при первом и/или втором селектировании включает селектирование на основе иммуноаффинности. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD57, CD4 или CD8, и восстановление клеток, не связанных с антителом, тем самым проводя отрицательное селектирование или восстановление клеток, связанных с антителом, тем самым осуществляя положительное селектирование, где восстановленные клетки истощены CD57+ клетками и/или обогащены CD4+ клетками или CD8+ клетками, и антитело иммобилизовано на магнитной частице. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом иммобилизованном на или присоединенным к матрице для аффинной хроматографии, где указанное антитело способно специфически связываться с CD57, CD4 или CD8 для осуществления отрицательного селектирования CD57+ клеток или положительное селектирование CD4+ или CD8+ клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD57, CD4 или CD8, и восстановление клеток, не связанных с антителом, тем самым проводя отрицательное селектирование или восстановление клеток, связанных с антителом, тем самым осуществляя положительное селектирование, где восстановленные клетки истощены CD57+ Т-клетками и/или обогащены CD4+ Т-клетками или CD8+ Т-клетками, и антитело иммобилизовано на магнитной частице. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, иммобилизованном на или присоединенным к матрице для аффинной

хроматографии, где указанное антитело способно специфически связываться с CD57, CD4 или CD8 для осуществления отрицательного селектирования CD57+ Т-клеток или положительного селектирования CD4+ или CD8+ Т-клеток.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сбор проводят во время или после момента, в который сконструированная популяция или размноженная популяция Т-клеток включает пороговое количество Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток, или пороговую концентрацию Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, пороговое количество или концентрация Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток достигается в течение точно или примерно 4, 5, 6 или 7 дней после инициации стимулирования.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, среди множества популяций сконструированных Т-клеток или популяций размноженных Т-клеток, пороговое количество или концентрация Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток достигается в течение точно или примерно 5 или 6 дней после инициации стимулирования, в, по меньшей мере, точно или примерно, или, по меньшей мере, точно или примерно 70%, 80%, 90% или 95% от множества. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, пороговое количество или концентрация Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток достигается в пределах точно или примерно 2, 3, 4 или 5 дупликациях популяции после инициации стимулирования.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сконструированная популяция или размноженная популяция содержит менее чем или примерно 3%, менее чем или примерно 2%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сконструированная популяция или размноженная популяция не содержит или по существу не содержит CD57+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, истощенная популяция, которая по существу не содержит CD57+ Т-клетки, содержит менее чем примерно или примерно 3%, менее чем примерно или примерно 2%, менее чем примерно или примерно 1%, менее чем примерно или примерно 0,1% или менее чем примерно или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, частота подобных наивным клеток в сконструированной популяции или размноженной популяции составляет, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% клеток в популяции. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, частота одних или более из CD25+ Т-клеток, CD27+ Т-клеток, CD28+ Т-клеток, CCR7+ Т-клеток или CD45RA+ Т-клеток в сконструированной популяции или размноженной популяции

составляет, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше чем или примерно частоты соответствующих клеток в популяции. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сконструированная популяция или размноженная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 40% CD27+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сконструированная популяция или размноженная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 25%, 30%, 35% или 40% CD28+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сконструированная популяция или размноженная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сконструированная популяция или размноженная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сконструированная популяция или размноженная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20% или 25% CCR7+ Т-клеток.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сбор клеток включает удаление клеточного дебриса споласкиванием или промыванием клеток. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сбор или получение дополнительно включает получения состава клеток для криоконсериирования или введения субъекту. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, собранные или полученные клетки составляют в присутствии фармацевтически приемлемого эксципиента. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, собранные или полученные клетки составлены для криоконсервирования в присутствии криопротектора. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, криопротектор содержит ДМСО. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, собранные или полученные клетки составляют в контейнере, необязательно, флаконе или пакете.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, разделение проходит перед сбором. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, разделение проходит перед или во время культивирования. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, разделение проходит после введения.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, рекомбинантный рецептор способен связываться с антигеном-мишенью, который связан с, является специфическим к и/или экспрессирован на клетке или ткани заболевания, расстройства или состояния. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, заболеванием, расстройством или состоянием является инфекционное заболевание или расстройство, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или рак. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, антигеном-мишенью является опухолевый антиген. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, антиген-мишень выбирают среди αvβ6 интегрина (avb6 интегрина), антигена созревания В-клетки (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), антигена рака яичек,

антигена рака/яичек 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, C-C Мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, протеогликана сульфата хондроитина 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста III типа (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, Fc рецептора подобного 5 (FCRL5; также известного как Fc рецептор гомолог 5 или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), а фолатного связывающего белка (FBP), фолатного рецептора альфа, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), erbB димеров, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита B, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), IL-22 рецептора альфа(IL-22Rα), IL-13 рецептора альфа 2 (IL-13Rα2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, L1 молекулы клеточной адгезии (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, члена семейства A содержащего богатые лейцином повторы 8 (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), c-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов члена D группы 2 натуральных киллеров (NKG2D), мелана A (MART-1), нервной молекулы клеточной адгезии (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), прогестеронового рецептора, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, трофобластного гликопротеина (TPBG также известного как 5T4), опухолеассоциированого гликопротеина 72 (TAG72), тирозиназа-зависимого белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), тирозиназа-зависимого белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR), рецептора 2 сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфического или патоген-экспрессированого антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированными молекулами, и/или молекулами, экспрессированными HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, рекомбинантный белок является или включает функциональный не-TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, рекомбинантный белок является химерным антигенным рецептором (CAR). В некоторых из любых таких вариантов осуществления, рекомбинантный рецептор является анти-

BCMA CAR. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, рекомбинантный белок является анти-CD19 CAR. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, химерный антигенный рецептор включает внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, спейсер и/или шарнирную область, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующую сигнальную область. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий домен, включает scFv.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, внутриклеточный сигнальный домен является или включает первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен вызывать первичный сигнал активации в Т-клетке, компонент сигнального домена Т-клеточного рецептора (TCR), и/или сигнальный домен, включающий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В некоторых из любых таких вариантов осуществления, внутриклеточный сигнальный домен является или включает внутриклеточный сигнальный домен CD3 цепи, необязательно, CD3-дзета (CD3ζ) цепи, или его сигнальную часть. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или его сигнальную часть.

Также представлены способы идентификации популяции клеток, способных размножаться, где способ включает измерение частоты CD57+ клеток в популяции, где популяция клеток идентифицирована как способная размножаться, если частота CD57+ клеток ниже пороговой частоты. Также представлены способы идентификации популяции клеток, способных размножаться, где способ включает измерение частоты CD57+ Т-клеток в популяции, где популяция клеток идентифицирована как способная к размножению, если частота CD57+ Т-клеток ниже пороговой частоты.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, пороговая частота представляет собой долю, которая составляет менее чем или примерно 35%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% или 0,1%. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, популяция, которая способна к размножению, размножается, по меньшей мере, точно или примерно 2-кратно, 4-кратно, 8-кратно или 16-кратно в течение 4, 5, 6, 7 или 8 дней культивирования в условиях, которые способствуют пролиферации или размножению.

Также представлены способы определения способности к размножению популяции Т-клеток, где способ включает измерение значения признака, ассоциированного с CD57 экспрессией в популяции Т-клеток, где если популяция Т-клеток определена как способная размножаться, если значение признака составляет менее чем или примерно пороговое значение признака.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, пороговое значение: i) составляет, составляет примерно или в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% ниже среднего или медианного измерения признака, ассоциированного с экспрессией CD57, и/или составляет ниже стандартного отклонения менее чем или примерно среднего или медианного измерения, во множестве эталонных

популяций Т-клеток; ii) составляет ниже наименьшего измерения признака, ассоциированного с экспрессией CD57, необязательно в пределах 50%, в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% ниже наименьшего измерения, в популяции из множества эталонных популяций Т-клеток; iii) составляет ниже среднего или медианного измерения признака, ассоциированного с экспрессией CD57, рассчитанного для более сем 65%, 75%, 80%, 85% образцов из множества эталонных композиций Т-клеток; где множеством эталонных популяций Т-клеток является множество популяций, которые не размножаются при культивации в условиях, которые способствуют пролиферации или размножению Т-клеток, необязательно где клетки не размножаются, по меньшей мере, точно или примерно 2-кратно, 4-кратно, 8-кратно или 16-кратно в пределах 4, 5, 6, 7 или 8 дней культивации.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, признаком является уровень или количество CD57 в полипептида, экспрессированного в общих Т-клетках, CD4+ Т-клетках или CD8+ Т-клетках. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, признаком является частота, доля или количество CD57+ Т-клеток, CD57+CD4+ Т-клеток или CD57+CD8+ Т-клеток, присутствующих в клеточной популяции. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, признаком является уровень или количество CD57 иРНК, присутствующей в Т-клетке в клеточной популяции. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, признаком является уровень или количество доступности хроматина гена, кодирующего CD57 (B3GAT1).

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, способ дополнительно включает измерение второго значения признака, ассоциированного с экспрессией одного или более вторых генных продуктов в популяции Т-клеток, где популяция способна размножаться, если значение признака составляет меньше чем или примерно пороговое значение признака, и если второе значение второго признака составляет больше чем или примерно второго пороша второго признака.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, вторым генным продуктом является маркер, ассоциированный с подобными наивным Т-клетками. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, один или более вторых генных продуктов выбирают из CD27, CD28, CCR7 или CD45RA. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, один или более вторых генных продуктов является CD27 и CD28.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, второе пороговое значение: i) составляет, составляет примерно или в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% выше среднего или медианного измерения признака, ассоциированного с экспрессией второго гена, и/или составляет выше одного стандартного отклонения больше чем или примерно среднего или медианного измерения, во множестве вторых эталонных композиций Т-клеток; ii) составляет выше наивысшего измерения второго признака, ассоциированного с экспрессией второго гена, необязательно в пределах 50%, в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% выше наивысшего измерения, в

композиции из множества эталонных композиций Т-клеток; iii) составляет ниже среднего или медианного измерения признака, ассоциированного с экспрессией второго гена, рассчитанного для более чем 65%, 75%, 80%, 85% образцов из множества эталонных композиций Т-клеток.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, вторым признаком является: (i) уровень или количество полипептида, кодированного вторым геном, присутствующим в общих Т-клетках, CD4+ Т-клетках или CD8+ Т-клетках; (ii) является уровень или количество полипептида, кодированного вторым геном, присутствующим на поверхности общих Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток; (iii) является признак, которым является частота, доля или количество Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток, положительных для экспрессии второго гена; (iv) является уровень или количество иРНК второго гена, присутствующей в Т-клетках; или (v) является уровень или количество доступности второго гена.

Также представлены способы генетического конструирования Т-клеток, где способ включает: (a) инкубирование Т-клеток из популяции Т-клеток, идентифицированной или определенной любыми способами, описанными в настоящем документе в условиях стимулирования, где указанные условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, тем самым создавая стимулированные Т-клетки; и (b) введение гетерологичного полинуклеотида в стимулированные Т-клетки, где указанное введение включает трансдуцирование стимулированных Т-клеток вирусным вектором, включающим гетерологичный полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток.

Также представлены в настоящем документе композиции клеток, включающие любые клетки, полученные способами, описанными в настоящем документе. Также представлены в настоящем документе композиции клеток, включающие CD57-CD4+ клетки. Также представлены в настоящем документе композиции клеток, включающие CD57-CD8+ клетки. Также представлены в настоящем документе композиции клеток, включающие CD57-CD3+ клетки.

Также представлены композиции клеток, включающие CD57- Т-клетки истощенной популяции, полученной любым способом, описанным в настоящем документе.

Также представлены композиции обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток, включающие CD57-CD4+ Т-клетки обогащенной популяции CD57-CD4+ Т-клеток, полученных любым способом, описанным в настоящем документе.

Также представлены композиции обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток, включающие CD57-CD8+ Т-клетки обогащенной популяции CD57-CD8+ Т-клеток, полученных любым способом, описанным в настоящем документе.

Также представлены композиции обогащенных CD57-CD3+ Т-клеток, включающие CD57-CD3+ Т-клетки обогащенной популяции CD57-CD3+ Т-клеток, полученных любым способом, описанным в настоящем документе.

Также представлены композиции клеток, включая популяцию стимулированной популяции Т-клеток, полученных любым способом, описанным в настоящем документе.

Также представлены композиции, включающие клетки сконструированной популяции Т-клеток, полученных любым способом, описанным в настоящем документе.

Также представлены композиции, включающие клетки размноженной популяции Т-клеток, полученных любым способом, описанным в настоящем документе.

Также представлены композиции, включающие популяцию Т-клеток, идентифицированных или определенных как способные размножаться, любым способом, описанным в настоящем документе.

Также представлены способы лечения субъекта, имеющего или предположительно имеющего заболевание, расстройство или состояние, где способ включает введение субъекту дозы Т-клеток из популяции сконструированных Т-клеток, полученных любым способом, описанным в настоящем документе, или размноженной популяции Т-клеток, полученных любым способом, описанным в настоящем документе.

Также представлено применение популяции сконструированных Т-клеток, полученных любым способом, описанным в настоящем документе, или размноженной популяции Т-клеток, полученных любым способом, описанным в настоящем документе для лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

Также представлено применение популяции сконструированных Т-клеток, полученных любым способом, описанным в настоящем документе, или размноженной популяции Т-клеток, полученных любым способом, описанным в настоящем документе, для производства лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

Также представлены изделия производства, включающие: (i) один или более реагентов для селектирования на основе иммуноаффинности клеток, специфических для CD57, CD4 и/или CD8; и (ii) инструкции по применению одного или более реагентов для осуществления любых способов, описанных в настоящем документе.

Также представлены изделия производства, включающие: (i) один или более реагентов для селектирования на основе иммуноаффинности клеток, специфических для CD57, CD4 и/или CD8; (ii) один или более стимулирующих реагентов, способных активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул; и (iii) инструкции по применению одного или более реагентов для осуществления любых способов, описанных в настоящем документе.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, реагент для селектирования на основе иммуноаффинности является или включает антитело, способное

специфически связываться с CD57, CD4 или CD8. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, реагент для селектирования на основе иммуноаффинности является или включает антитело, способное специфически связываться с CD57. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, антитело иммобилизовано на магнитной частице или иммобилизовано на или присоединено к матрице для аффинной хроматографии.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, стимулирующий реагент включает (i) первичный агент, который специфически связывается с членом TCR комплекса, необязательно который специфически связывается с CD3, и (ii) вторичный агент, который специфически связывается с костимулирующей молекулой Т-клетки, необязательно, где костимулирующую молекулу выбирают из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, один или оба из первичных и вторичных агентов включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, первичные и вторичные агенты включают антитело, необязательно, где стимулирующий реагент включает инкубирование с анти-CD3 антителом и анти-CD28 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, первичный агент и вторичный агент присутствует или присоединен на поверхности твердой подложки. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, твердая подложка является или включает гранулу, необязательно, парамагнитную гранулу. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, первичный агент и вторичный агент обратимо связан на поверхности реагента из олигомерных частиц, включая множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина.

Также представлены изделия производства, включающие (i) любую композицию, описанную в настоящем документе; и (ii) инструкции по введению субъекту.

Также представлена в настоящем документе терапевтическая композиция Т-клеток, включающая CD4+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где, по меньшей мере, 80% или все рецептор$^+$/CD8$^+$ клетки в композиции являются CD57- и, по меньшей мере, 80% из всего рецептор$^+$/CD4$^+$ клеток в композиции являются CD57-.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 99%, примерно 100% или 100% клеток в композиции являются CD4+ Т-клетками и CD8+ Т-клетками. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, по меньшей мере, 80% ли все рецептор$^+$/CD3$^+$ клетки в композиции являются CD57-. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или, по меньшей

мере, примерно 90%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 99%, примерно 100% или 100% клеток в композиции являются CD3+ Т-клетками. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, отношение рецептор+/CD4+ Т-клеток к рецептор+/CD8+ Т-клеткам в композиции составляет от примерно 1:3 и примерно 3:1. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, отношение рецептор+/CD4+ Т-клеток к рецептор+/CD8+ Т-клеткам в композиции составляет точно или примерно 1:1.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, рекомбинантный белок является или содержит рекомбинантный рецептор, который способе связываться с белком-мишенью, который ассоциирован с, является специфическим к и/или экспрессирован на клетке или ткани заболевания, расстройства состояния. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, рекомбинантный белок является химерным антигенным рецептором (CAR). В некоторых из любых таких вариантов осуществления, количество жизнеспособных Т-клеток в композиции составляет от точно или примерно 10×10^6 клеток и точно или примерно 200×10^6 клеток, необязательно, где количество жизнеспособных Т-клеток в композиции составляет от точно или примерно 10×10^6 клеток и точно или примерно 100×10^6 клеток, точно или примерно 10×10^6 клеток и точно или примерно 70×10^6 клеток, точно или примерно 10×10^6 клеток и точно или примерно 50×10^6 клеток, точно или примерно 50×10^6 клеток и точно или примерно 200×10^6 клеток, точно или примерно 50×10^6 клеток и точно или примерно 100×10^6 клеток, точно или примерно 50×10^6 клеток и точно или примерно 70×10^6 клеток, точно или примерно 70×10^6 клеток и точно или примерно 200×10^6 клеток, точно или примерно 70×10^6 клеток и точно или примерно 100×10^6 клеток или точно или примерно 100×10^6 клеток и точно или примерно 200×10^6 клеток, все включительно. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, объем композиции составляет от 1,0 мл и 10 мл, включительно, необязательно точно или примерно 2 мл, точно или примерно 3 мл, точно или примерно 4 мл, точно или примерно 5 мл, точно или примерно 6 мл, точно или примерно 7 мл, точно или примерно 8 мл, точно или примерно 9 мл или точно или примерно 10 мл или любое значение между любыми из предшествующих.

Краткое описание чертежей

На ФИГ. 1A-1D показано общее количество клеток (**ФИГ. 1A**), кратность размножения (**ФИГ. 1B**), долю жизнеспособности (**ФИГ. 1C**) и долю Ki-67+ клеток (маркер, ассоциированный с началом клеточного цикла; **ФИГ. 1D**) среди CD8+ Т-клеток, полученных от семи разных доноров (доноры A-G), в течение приблизительно 240 часов после начала стимулирования в типовом производственном процессе для первичных Т-клеток человека или подобном процессе без трансдукции клеток.

На ФИГ. 2A показан анализ проточной цитометрией экспрессии CD57 и Ki-67 в разные моменты времени в течение приблизительно 216 часов после начала

стимулирования в типовом процессе для первичные Т-клетки человека. На **ФИГ. 2B** показана доля CD57+ клеток в клеточной популяции во время стимулирования и культивирования, для трех разных доноров (доноры A-C). На **ФИГ. 2C** показана доля Ki-67+ клеток среди CD57+ клеток или CD57- клеток в клеточной популяции во время стимулирования и культивирования. На **ФИГ. 2D** показана доля CD57+ клеток в CD4+ клеточной популяции во время стимулирования и культивирования, для трех разных доноров (доноры A-C). На **ФИГ. 2E** показана экспрессия CD57 и Ki67 на клетках из донорских клеточных композиций, в течение времени, с последующим стимулированием. Клеткам одной донорной клеточной композиции требуется 8 дней для достижения критерия сбора («8д до сбора»), в клеткам другой донорной клеточной композиции требуется только 7 дней для достижения критерия сбора («7д до сбора»). На **ФИГ. 2F** показана экспрессия CD45RA и CD27 на клетках из донорных клеточных композиций, описанных на ФИГ. 2E.

На ФИГ. 3A показан анализ проточной цитометрией экспрессии CD69 и CD25 (маркеров, ассоциированных с активацией) среди CD57+ клеток и CD57- клеток в клеточной популяции во время стимулирования и активации в типовом способе для первичных Т-клеток человека. На **ФИГ. 3B** и **3C** показан анализ иерархической кластеризацией для экспрессии разных поверхностных маркеров, ассоциированных с фенотипами дифференциации Т-клеток (например, подобными наивным Т-клетками, эффекторными Т (T_{EFF}) клетками, Т-клетками памяти, центральными Т-клетками памяти (T_{CM}), эффекторными Т-клетками памяти (T_{EM}), эффекторными RA Т-клетками памяти (T_{EMRA})) и экспрессией CD57 (**ФИГ. 3B**) или Ki-67 (**ФИГ. 3C**). Каждый ряд представляет клеточную композицию от индивидуального донора, столбцы представляют маркеры или сочетания маркеров, которые ассоциированы с фенотипами дифференциации Т-клеток.

На **ФИГ. 4A** показано количество общих клеток и доля жизнеспособных клеток в течение приблизительно 240 часов после начала стимулирования в типовом производственном процессе, титрованных клеточных композиций, содержащих смесь CD57+ и CD57- клеток при следующей частоте: (1) 100% CD57+ клеток; (2) 75% CD57+ клеток; (3) 25% CD57+ клеток; и (4) 0% CD57+ клеток. Указан типовой критерий сбора. На **ФИГ. 4B** показаны изображения лунок с клеточной культурой через 48 часов после начала стимулирования, показывая кластеризацию клеток в присутствии стимулирующего реагента, при стимулировании и культивировании титрованных клеточных композиций. На **ФИГ. 4C** показано количество IL-2 (мкг/мл), присутствующее в культуральной среде через 12 и 48 часов после начала стимулирования, при стимулировании и культивировании титрованных клеточных композиций.

На **ФИГ. 5A** и **5B** показана доля CD57+ Т-клеток (**ФИГ. 5A**), CD27+CD28+ Т-клеток (**ФИГ. 5B**). На **ФИГ. 5C** показана экспрессия CD27 для четырех донорных клеточных композиций, которые не были истощены CD57+ клетками (не истощенные) или которые были истощены CD57+ клетками (истощенные). На **ФИГ. 5D** показана экспрессия Ki67 в истощенных и не истощенных CD3+ клеточных композициях. На **ФИГ.**

5E показана длительность культивирования до сбора (с начала стимулирования до момента времени, в который достигается критерий сбора) для первичных CD8+ клеток, полученных от субъектов, которые были истощены CD57+ клетками (истощенные) или которые не были истощены CD57+ клетками (не истощенные). На **ФИГ. 5F** показано общее количество Т-клеток в течение времени в истощенных и не истощенных клеточных композициях, после стимулирования. На **ФИГ. 5G** показана доля клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) после трансдукции, в истощенных и не истощенных клеточных композициях.

На **ФИГ. 6A** показан график с «усами», показывающий долю CD57+ Т-клеток в CD4+ и CD8+ Т-клетках, полученных от пациентов с неходжкинской лимфомой (NHL) для конструирования клеток для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) с применением типового производственного процесса. Рамки представляют интерквартильный интервал, и «усы» представляют полный спектр данных. На **ФИГ. 6B** показано отношение между долей CD57+CD8+ клеток и долей Ki-67+ клеток в разных клеточных популяциях, полученных от пациентов с NHL. На **ФИГ. 6C** показан анализ иерархической кластеризацией для экспрессии разных поверхностных маркеров, ассоциированных с фенотипами дифференциации Т-клеток (например, подобных наивным Т-клеток, эффекторных Т-клеток (T_{EFF}), Т-клеток памяти, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), концевых эффекторных клеток) и экспрессией CD57 в клеточных популяциях, полученных от пациентов с NHL. Каждый ряд представляет отдельного пациента, столбцы представляют маркеры или комбинации маркеров, которые ассоциированы с фенотипами дифференциации Т-клеток. На **ФИГ. 6D** показана доля живых CD57+ клеток, экспрессирующих Ki67 в подмножествах клеточных популяций, сгруппированная по статусу экспрессии CD27 и CD45RA. На **ФИГ. 6E** показана доля живых CD8+CD57+ клеток в подмножествах клеточных популяций, отсортированных по экспрессии CD27 и CD45RA (верхняя панель) и доля живых CD4+CD57+ клеток в подмножествах клеточных популяций, отсортированных по экспрессии CD27 и CD45RA (нижняя панель).

На **ФИГ. 7** показано отношение между долей центральных CD4+ Т-клеток памяти/подобных наивным CD4+ Т-клеток в выходящей терапевтической композиции Т-клеток (например, лекарственном продукте) и количество дупликаций популяций до достижения критерия сбора (Spearman ρ: -0,54; p-значение: <0,001). Похожий результат наблюдается для CD8+ Т-клеток в выходящей терапевтической композиции Т-клеток (например, лекарственном продукте).

На **ФИГ. 8A** показано количество дупликаций популяций до достижения критерия сбора для высокой (0,35×10^6 клеток/мл) и низкой (0,05×10^6 клеток/мл) плотности посева во время стадии размножения производственного процесса. На **ФИГ. 8B** показана доля CD27+CAR+CD8+ Т-клеток в выходящей терапевтической композиции как функция от плотности посева во время стадии размножения производственного процесса. На **ФИГ. 8C** показано влияние длительность обработки на количество центральных Т-клеток

памяти в выходящей композиции Т-клеток.

На **ФИГ. 9A-9D** показаны кривые выживания Каплана-Мейера для субъектов, которым была введена CAR^+ композиция Т-клеток, деленных на группы, которые вводили композиции, содержащие долю $CCR7^+CD27^+$ CAR^+ Т-клеток среди $CD4^+$ CAR^+ Т-клеток (**ФИГ. 9A** для выживания без прогрессирования, **ФИГ. 9C** для длительности ответа) и среди $CD8^+$ CAR^+ Т-клеток (**ФИГ. 9B** для выживания без прогрессирования, **ФИГ. 9D** для длительности ответа), которая выше или ниже определенного порогового уровня.

На **ФИГ. 10** показана PFS кривая на основе оптимально разделенного лог-рангового критерия для пациентов с “высоким” или “низким” количеством дупликаций популяций (PDL) в CD8+/CAR+ Т-клетках. Низкая PDL относится к <6 PDL и >6 PDL относится к высокой PDL.

На **ФИГ. 11** показана доля CD27+CD28+ Т-клеток в обогащенных CD4+ (левая панель) и CD8+ (правая панель) входных композициях, полученных у пациентов с неходжкинской лимфомой.

На **ФИГ. 12** показано отношение между долей эффекторных Т-клеток памяти в обогащенных CD4+ входных композициях и количеством дупликаций популяции, необходимых для достижения критерия сбора (Spearman ρ: 0.43; p-значение: <0,001). Похожий результат получают для обогащенных CD8+ входных композиций.

На **ФИГ. 13A-D** показано общее количество живых клеток (ФИГ. 13A), жизнеспособность (ФИГ. 13B) и фенотип (ФИГ. 13C и 13D) во время и после производственных прогонов, включая множество не расширенных и расширенных процессов конструирования.

На **ФИГ. 14** показана доля CD57+ клеток в CD4+ и CD8+ клеточных популяциях во время и после производственных прогонов, включая множество не расширенных и расширенных процессов конструирования.

Подробное описание

В настоящем документе представлены способы и композиции, применяемые для, inter alia, селектирования, выделения, стимулирования, активирования, генетического конструирования или размножения образца, популяций или композиций клеток, имеющих пониженную частоту CD57+ Т-клеток, например, по сравнению с исходным клеточным материалом или биологическими образцами. В некоторых аспектах, в настоящем документе представлен способ обогащения Т-клеток, который является или включает селектирование, выделение или удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, например, для создания популяции обогащенных CD57- Т-клеток или популяции истощенных CD57+ клеток. В некоторых аспектах, в настоящем документе представлен способ обогащения Т-клеток, который является или включает селектирование, выделение или удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, например, для создания популяции обогащенных CD57- Т-клеток или популяции, истощенной CD57+ Т-клетками.

В некоторых аспектах, в настоящем документе представлен способ стимулирования популяции CD57- Т-клеток через инкубирование клеток популяции в

условиях стимулирования. Также в настоящем документе представлен способ генетического конструирования Т-клеток через введение гетерологичного полипептида в клетки, такие как клетки, составляющие или происходящие из популяции обогащенных CD57- Т-клеток.

Конкретные варианты осуществления предполагают, что существующие способы создания сконструированных Т-клеток, например, сконструированных Т-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (CAR), могут включать шаги, стадии или фазы, где популяции или композиции Т-клеток пролиферируют или размножаются. Однако, в некоторых случаях, часть популяций или композиций могут не демонстрировать какую-либо пролиферацию или размножение, или, в некоторых случаях, могут размножаться медленно, тем самым требуя дополнительных дней для завершения процесса конструирования.

В некоторых аспектах, существующие способы или процессы создания или производства сконструированных клеточных композиций могут дать гетерогенность в производственном процессе. В некоторых аспектах, фенотипы, ассоциированные с Т-клетками памяти, могут влиять на клинический результат (см., например, Fraietta et al., Nat Med. 2018; 24(5):563-571; и Larson et al., Cancer Res. 2018; 78(13 Suppl): Abstract nr 960). В некоторых случаях, обогащение клетками, демонстрирующими фенотипы ранних Т-клеток памяти, может улучшать производство сконструированных клеточных композиций (см., например, Singh et al., Sci Trans Med. 2016; 8(320):320ra3).

Представленные способы и композиции относятся к указанным вопросам. Представленные способы и композиции связаны, по меньшей мере, частично, с популяциями клеток, например, популяциями обогащенных CD57- Т-клеток, которые претерпевают улучшенную или более быструю пролиферацию и размножение, например, во время процессов стимулирования или конструирования Т-клеток. CD57 (которые также известны как HNK1 и LEU7) представляют собой бета-1,3-глюкуронилтрансферазу на поверхности Т и NK лимфоцитов. В некоторых аспектах, экспрессия CD57, например, поверхностная экспрессия, ассоциирована со зрелыми, эффектор-дифференцированными субпопуляциями Т и NK клеток. В некоторых аспектах, экспрессия CD57 соответствует Т-клеткам или Т-клеточным популяциям, в которых отсутствует экспрессия костимулирующих рецепторов CD28 и CD27, которые, в определенных аспектах, могут влиять на длительную пролиферацию и выживание клеток. В конкретных аспектах, экспрессия CD57 также может идентифицировать клетки с меньшим или пониженным пролиферативным потенциалом. В некоторых аспектах, CD57+CD28- клеточные популяции могут демонстрировать уменьшенную длину теломера и пониженный пролиферативный потенциал по сравнению с CD57- клеточными популяциями (обсуждается у Strioga, Pasukoniene, & Characiejus, Immunol. (2011)).

Конкретные варианты осуществления предполагают, что снижение частоты CD57+ Т-клеток от исходного клеточного материала, применяемого в процессах генетического конструирования, будут обогащать клетками с большим пролиферативным потенциалом.

В некоторых аспектах, отрицательное селектирование CD57+ Т-клеток улучшает производственный успех и консистентность лекарственного продукта через предварительное обогащение клеток, которые лучше готовы к размножению. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления, обогащение популяций или композиций клеток клетками, демонстрирующими повышенный пролиферативный потенциал, может снизить степень дифференциации эффекторных клеток, что должно помочь в улучшении профиля консистентности целевого продукта среди субъектов в аутологичных условиях или среди партий в аллогенных условиях (CD27+, CCR7+ Т-клетки).

В некоторых вариантах осуществления, способы используют в связи с процессом, который генерирует или продуцирует генетически сконструированные клетки, подходящие для клеточной терапии, таким образом, который может быть более быстрым и эффективным, чем альтернативные процессы. В некоторых вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем документе, имеют высокую степень успеха для создания или продуцирования композиций сконструированных клеток из более широкой популяции субъектов, чем та, которая может быть возможной при использовании альтернативных процессов. Таким образом, в некоторых аспектах, скорость и эффективность предлагаемых способов создания сконструированных клеток для клеточной терапии позволяют упростить планирование и координацию лечения клеточной терапией, например аутологичной терапией, для более широкой популяции субъектов, чем это возможно для некоторых альтернативных способов. В некоторых аспектах, предполагается, что истощение CD57+ клеток (например, CD57+ Т-клеток) является преимуществом, например, за счет улучшения консистентности клеточной популяции в последующих процессах. Например, в настоящем документе наблюдается, что истощение CD57+ клеток может истощать клетки с меньшим или пониженным пролиферативным потенциалом, так что истощенные композиции демонстрируют улучшенную консистентность в скоростях пролиферации клеток. Соответственно, улучшение консистентности скоростей пролиферации клеток может улучшить консистентность продолжительности, необходимой для достижения клеточной популяцией критерия сбора. Кроме того, в настоящем документе отмечается, что истощение CD57+ клеток перед трансдуцирования клеточной популяции вектором, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR), может улучшить консистентность экспрессии CAR трансдуцированными клетками.

В некоторых аспектах, предварительное селектирование входящих донорных клеток с улучшенным пролиферативным потенциалом, например, через удаление CD57+ Т-клеток или скрининг на меньшие количества CD57+ Т-клеток, может предложить улучшенный контроль процесса для множества клеток, применяемых с процессе для создания клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия CD57 может служить в качестве биомаркера, показывающего клетки, которые демонстрируют замедленный или плохой рост. Таким образом, некоторые из представленных вариантов осуществления, связаны со способами, которые применяют один или более реагентов

селектирования или стадий процесса для селективного удаления CD57+ клеток до процесса стимулирования, генетического конструирования или размножения клеток. В некоторых аспектах, такие реагенты и стадии процесса могут применяться в сочетании с CD8+ и CD4+ стратегиями селектирования. Например, в некоторых вариантах осуществления, селектирование CD57+ клеток применяют для удаления или истощения CD57+ клеток из образца, композиции или популяции клеток до любых стадий селектирования CD8+ или CD4+. Например, в некоторых вариантах осуществления, селектирование CD57+ Т-клеток применяют для удаление или истощения CD57+ Т-клеток из образца, композиции или популяции клеток до любых стадий CD8+ или CD4+ селектирования, тем самым создавая CD57-истощающую популяцию. В некоторых аспектах, может быть предпочтительным истощать CD57+ клетки через отрицательное селектирование (в противоположность положительному селектированию), например, до любых стадий для CD8+ или CD4+ селектирования. В некоторых аспектах, истощение CD57+ клеток через отрицательное селектирование, например, до любых стадий для CD8+ или CD4+ селектирования, снижает вероятность того, что CD57-истощенная популяция будет загрязнена одним или более реагентами или растворами, применяемыми на стадии CD57 селектирования.

В некоторых вариантах осуществления, селектирование CD57+ Т-клеток проводят для удаления или истощения CD57+ Т-клеток из образца, композиции или популяции клеток после любых стадий CD8+ или CD4+ селектирования. В некоторых аспектах, такие реагенты и стадии процесса могут применяться в сочетании со стратегиями CD3+ селектирования. Например, в некоторых вариантах осуществления, селектирование CD57+ Т-клеток применяют для удаления или истощения CD57+ Т-клеток из образца, композиции или популяции клеток до любых стадий CD3+ селектирования. В некоторых вариантах осуществления, селектирование CD57+ Т-клеток применяют для удаления или истощения CD57+ Т-клеток из образца, композиции или популяции клеток после любых стадий CD3+ селектирования. В некоторых вариантах осуществления, CD57+ клетки селектируют или удаляют с CD57-направленными магнитными гранулами, которые связывают CD57+ клетки, например, в колонке, и затем промывка колонки (несвязанные фракции) будет содержать источник CD57+ истощенных клеток, например, популяцию клеток, обогащенную CD57- Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, CD57+ Т-клетки селектируют или удаляют с CD57-направленными магнитными гранулами, которые связывают CD57+ Т-клетки, например, в колонке, и затем промывка колонки (несвязанные фракции) будет содержать источник CD57+ истощенных клеток, например, популяцию клеток, обогащенную CD57- Т-клетками

Конкретные варианты осуществления предполагают, что некоторые существующие ex vivo протоколы активации или размножения Т-клеток вероятно снижают присутствие CD57+ Т-клеток после некоторого количества времени, например, после первых 48 часов процесса, так как CD57+ Т-клетки наименее вероятно пролиферируют. В некоторых аспектах, CD57+ клетки (например, CD57+ Т-клетки) либо гибнут во время таких

процессов, либо их частота уменьшается за счет подмножеств клеток, которые способны к устойчивому размножению. Однако, хотя естественное снижение CD57+ Т-клеток может иметь место во время таких процессов, естественное снижение не контролирует количество клеток, попадающих в процесс, которые демонстрируют высокий пролиферативный потенциал (например, CD57- клетки). Таким образом, в некоторых аспектах, так как CD57+ клетки (например CD57+ Т-клетки) являются жизнеспособными, но менее пролиферативными клетками, они вносят свой вклад в общее начальное количество клеток, входящих в процесс. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, преимущество удаления CD57+ Т-клеток или верификации низкого содержания CD57+ Т-клеток в образце, композиции или популяции, гарантирует то, что CD57- Т-клетки, например, клетки со способностью пролиферировать, не составят меньшую популяцию во входящем материале. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, обеспечивание низкой частоты CD57+ Т-клеток или пониженной доли пролиферирующих клеток может снизить случаи, относящиеся в пролонгации времени процесса, повышенной клеточной дифференциации и/или неспособность достичь критериев сбора во время процессов конструирования.

В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления основаны на наблюдении, что во время процесса конструирования клеток, такого как производственный процесс создания композиций, содержащих Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор для клеточной терапии, множество клеток экспрессируют или активируют маркеры, которые ассоциированы со стимулированием или активацией Т-клеток, включая CD25 и CD69 после стимулирования, например, инкубирования клеток в присутствии анти-CD3/анти-CD8 антител. В некоторых аспектах, наблюдается, что только часть клеток поступает в клеточный цикл, как показано на основе экспрессии Ki-67. В некоторых случаях, Ki-67+ клетки в первую очередь включают клетки, экспрессирующие CD27 и CD28, в то время как наблюдается, что Ki67- популяции обогащены CD57+ клетками и демонстрируют CD27-CD28-фенотипы. В некоторых аспектах, в настоящем документе наблюдается, что CD57+ клетки демонстрируют фенотипы, ассоциированные со стимулированием и активацией, и сохраняются на ранней стадии производственного процесса. В некоторых аспектах, частота CD57+Т-клеток снижается приблизительно через 48 часов после стимулирования, что обычно совпадает с размножением и повышенной жизнеспособностью Т-клеток. В некоторых аспектах, конкретные типы клеток, такие как CD57+ клетки (например, CD57+ Т-клетки), демонстрируют низкое или отсутствие размножения во время стимулирования или культивирования, при этом продолжая использовать факторы роста и/или реагенты активации, что дает гетерогенность процесса и продукта.

В некоторых аспектах, наблюдается, что когда CD57+ клетки (например, CD57+ Т-клетки) выбирают и комбинируют с CD57- клетками (например, CD57+ Т-клетками) в разных соотношениях до стимулирования, частота CD57+ клеток в клеточной композиции до стимулирования (например, входной композиции) ассоциирована с большей

длительностью процесса. В некоторых аспектах, также наблюдается, что клеточные композиции, такие как композиции, содержащие CAR+ Т-клетки, не размножаются или пролиферируют, если 95% или более, например, 100% Т-клеток в композиции являются CD57+ Т-клетками.

В некоторых аспектах, хотя CD27+ Т-клетки могут вносить вклад в размножение клеток во время производственного процесса для создания сконструированных Т-клеток, CD57+ клетки например, CD57+ Т-клетки) в общем не размножаются, и наблюдается, что они вносят минимальный вклад в клетки в сконструированной клеточной композиции (например, клеточной композиции для введения). Таким образом, присутствие CD57+ Т-клеток может повлиять на производственный процесс, и также наблюдается, что они вносят вклад в вариабельность процесса, например, во время культивирования для размножения и других атрибутов клеточной композиции. В некоторых аспектах, как представлено в настоящем документе, селективное истощение CD57+ Т-клеток в начале производственного процесса, например, до стимулирования клеток, может улучшить консистентность, качество и эффективность сконструированной клеточной композиции.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, представленные способы могут снизить длительность процесса создания клеточной терапии и, следовательно, в определенных аспектах, улучшить консистентность производственных графиков. Кроме того, в некоторых аспектах, скорость и эффективность представленных способов создания сконструированных клеток для клеточной терапии позволяет упростить планирование и координацию клеточной терапии, такой как аутологичная терапия, до более широкой популяции субъектов, которая может быть возможной с применением некоторых альтернативных способов.

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы успешно удаляют, по меньшей мере, часть не пролиферативных клеток в начале процесса создания клеток, применяемых для клеточной терапии, например, популяций или композиций сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах, это достигается через селектирование CD57+ клеток (например, CD57+ Т-клеток) до начала таких процессов, или через скрининг для того, чтобы обеспечить применение только клеточных композиций или популяций, не имеющих или имеющих низкое содержание CD57+ Т-клеток, для таких процессов, улучшить эффективность процессов, например, скорость или частоту успешного создания клеточных популяций, подходящих для применения в клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы снижают требуемую длительность и количество дупликаций клеток, например, во время пролиферации, культивирования или размножения, для сбора с получением необходимого количества Т-клеток для использования в качестве клеточной терапии. Таким образом, не желая быть связанными теорией, некоторые варианты осуществления предполагают, что представленные способы увеличивают или подтверждают достаточное количество поступающих донорных клеток, которые демонстрируют улучшенный пролиферативный потенциал.

В некоторых вариантах осуществления, клеточные терапии, созданные из популяций обогащенных CD57- Т-клеток, содержат Т-клетки с меньшей степенью дифференциации, чем клеточные терапии, созданные в альтернативных процессах. В некоторых вариантах осуществления, пониженная дифференциация клеточных терапий улучшает консистентность среди клеточных терапий, созданных представленными процессами (например, по сравнению с альтернативными процессами, например, клеточными терапиями, созданными из популяций клеток, содержащих вариабельное количество CD57+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, пониженная клеточная дифференциация клеточных терапий улучшает профили качества продукта клеточных терапий.

Конкретные аспекты предполагают, что CD57 экспрессируются NK и NKT-клетками в дополнение к Т-клеткам, все из которых могут присутствовать в биологическом образце, например, материале лейкафереза. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, отрицательное селектирование для CD57+ клеток (например CD57+ Т-клеток) снижает остаточные не-Т-клетки и улучшает чистоту Т-клеток. Таким образом, представленные способы повышают чистоту популяций Т-клеток, которые обработаны, например, стимулированием, трансдукцией или размножением, а также Т-клеточную чистоту полученных клеточных терапий.

Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, упомянутые в этой заявке, включены в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была включена в качестве ссылки отдельно. Если определение, изложенное в настоящем документе, противоречит или иным образом несовместимо с определением, изложенным в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые в настоящем документе включены в качестве ссылки, определение, изложенное в настоящем документе, имеет преимущественную силу над определением, которое включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для организационных целей и не должны толковаться как ограничивающие описанный объект.

I. ПОПУЛЯЦИИ ОБОГАЩЕННЫХ CD57- Т-КЛЕТОК

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлены популяции обогащенных CD57- Т-клеток (также названные в настоящем документе CD57- Т-клеточные популяции, композиции обогащенных CD57- Т-клеток или CD57- композиции Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления, представленные популяции обогащенных CD57- Т-клеток применяют в сочетании со способами стимулирования, активации, конструирования, трансдуцирования, культивирования или размножения Т-клеток, например, Т-клеток, составляющих или происходящих из популяции обогащенных CD57- Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяции обогащенных CD57- Т-клеток возникают при или являются продуктом

выделения, селектирования или обогащения, например, биологического образца, такого как биологический образец, содержащий одну или более иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток является или включает жизнеспособные Т-клетки, CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, клеточные популяции обогащенных CD57- Т-клеток являются или включают жизнеспособные Т-клетки, CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки или комбинацию любых из вышеописанных. В разных вариантах осуществления, клеточные популяции обогащенных CD57- Т-клеток являются или включают жизнеспособные CD57- Т-клетки, CD57- CD3+ Т-клетки, CD57- CD4+ Т-клетки, CD57- CD8+ Т-клетки или комбинацию любых из вышеперечисленных.

Конкретные варианты осуществления предполагают, что количество CD57 экспрессии, например, количество CD57+ Т-клеток, в образце, популяции или композиции, содержащей клетки, может быть измерено любыми подходящими известными средствами. В некоторых вариантах осуществления, CD57 экспрессию измеряют в образце, популяции или композиции для измерения, оценки или определения количества, частоты или доли CD57+ клеток, например, CD57+ Т-клеток в образце, популяции или композиции. В некоторых вариантах осуществления, CD57 экспрессию измеряют в образце, популяции или композиции для измерения, оценки или определения количества, частоты или доли CD57+ клеток, например, CD57+ Т-клеток в образце, популяции или композиции.

В некоторых вариантах осуществления, клеточные композиции, имеющие высокую долю CD57+ клеток, могут дать низкую долю клеток, способных к пролиферативному размножению. В некоторых случаях, сконструированные клеточные композиции с высокой долей CD57+ клеток ассоциированы с пониженным пролиферативным потенциалом и могут дать увеличенное время процесса, более высокие дупликации для достижения порогового количества клеток, повышенной клеточной дифференциации и/или неспособности достигнуть критерия сбора в производственном процессе для получения сконструированной композиции Т-клеток для клеточной терапии.

Также в некоторых аспектах представлены способы идентификации популяции клеток, способных к размножению, где способ включает измерение частоты CD57+ клеток в популяции, где популяция клеток идентифицирована как способная к размножению, если частота CD57+ клеток ниже пороговой частоты. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, пороговой частотой является доля, доля, которая составляет менее чем или примерно 35%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% или 0,1%. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, популяция, которая способна к размножению, размножается, по меньшей мере, точно или примерно 2-кратно, 4-кратно, 8-кратно или 16-кратно в пределах 4, 5, 6, 7 или 8 дней культивирования в условиях, которые способствуют пролиферации или размножению.

Также в некоторых аспектах представлены способы определения для способности к размножению популяции Т-клеток, где способ включает измерение значения признака,

ассоциированного с CD57 экспрессией в популяции Т-клеток, где популяция Т-клеток определена как способная к размножению, если значение признака составляет менее чем или примерно порогового значения признака.

В некоторых вариантах осуществления, порог порогового значения: i) составляет точно, примерно или в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% ниже среднего или медианного измерения признака, ассоциированного с CD57 экспрессией, и/или ниже одного стандартного отклонения менее чем или примерно среднего или медианного измерения, во множестве эталонных Т-клеточных популяций; ii) ниже наименьшего признака, ассоциированного с CD57 экспрессией, необязательно в пределах 50%, в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% ниже наименьшего измерения, в популяции из множества эталонных Т-клеточных популяций; iii) ниже среднего или медианного измерения признака, ассоциированного с CD57 экспрессией, рассчитанной для более чем 65%, 75%, 80%, 85% образцов из множества эталонных композиций Т-клеток; где множеством эталонных Т-клеточных популяций является множество популяций, которые не размножаются при культивировании в условиях, которые способствуют пролиферации или размножению Т-клеток, необязательно, где клетки не размножаются, по меньшей мере, точно или примерно 2-кратно, 4-кратно, 8-кратно или 16-кратно в пределах 4, 5, 6, 7 или 8 дней культивирования.

В некоторых вариантах осуществления, признаком является уровень или количество CD57 в полипептиде, экспрессированном в общих Т-клетках, CD4+ Т-клетках или CD8+ Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления, признаком является частота, доля или количество CD57+ Т-клеток, CD57+CD4+ Т-клеток или CD57+CD8+ Т-клеток, присутствующих в клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, признаком является уровень или количество CD57 в полипептиде, экспрессированном в CD3+ Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления, признаком является частота, доля или количество CD57+CD3+ Т-клеток, присутствующих в клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, признаком является уровень или количество CD57 иРНК, присутствующих в Т-клетках в клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, признаком является уровень или количество доступности хроматина гена, кодирующего CD57 (B3GAT1).

В некоторых вариантах осуществления, где способ дополнительно включает измерение второго значения второго признака, ассоциированного с экспрессией одного или более вторых генных продуктов в популяции Т-клеток, где популяция способна к размножению, если значение признака составляет менее чем или примерно пороговое значение признака, и если второе значение второго признака составляет больше чем или примерно второго порога второго признака.

В некоторых вариантах осуществления, вторым генным продуктом является маркер, ассоциированный с подобными наивным Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, один или более вторых генных продуктов выбирают из CD27, CD28,

CCR7 или CD45RA. В некоторых вариантах осуществления, одним или более генными продуктами являются CD27 и CD28.

В некоторых вариантах осуществления, отрицательной экспрессией, например, отрицательной экспрессией CD57 или CD57-, является экспрессия, равная или меньше, чем уровень фоновой экспрессии, например, определенный с применением стандартной методики, такой как методика, включающая окрашивание антителом. В некоторых вариантах осуществления, отрицательная экспрессия равна или меньше, чем уровень фоновой экспрессии, определенной подходящими методами оценки экспрессии белка или гена, такими как, но не ограниченными ими, методы на основе иммуногистохимии, иммунофлуоресценции или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, положительная экспрессия, например, конкретного белка, является или включает поверхностную экспрессию белка в количестве, уровне или концентрации выше фоновой. В конкретных вариантах осуществления, отрицательная экспрессия, например, конкретного белка, является или включает поверхностную экспрессию белка в количестве, уровне или концентрации, равно или ниже фоновой.

В некоторых вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем документе, включают одну или более стадий оценки, измерения, определения и/или количественной оценки экспрессии одного или более белков или генов (например, CD57) в образце, популяции или композиции, таких как количественное измерение клеток в образце, композиции или популяции с положительной или отрицательной экспрессией белка или гена (например, CD57). Такие стадии могут включать оценку, измерение, определение и/или количественную оценку любого подходящего признака, ассоциированного с экспрессией, такое как измерение уровней белка, поверхностного белка, иРНК или доступностью гена, например, доступностью эпигенетического гена.

В некоторых вариантах осуществления, экспрессия белка (например, CD57) является или включает оценку, измерение, определение и/или количественную оценку уровня, концентрации белка или белка, кодированного геном, экспрессированным на поверхности клеток. В конкретных вариантах осуществления, экспрессию белка (например, CD57) оценивают через оценку, измерение, определение и/или количественное определение поверхностной экспрессии белка, например, уровня, количества или концентрации белка на поверхности клеток. В конкретных вариантах осуществления, количество, частота или доля клеток, положительных для поверхностной экспрессии белка, например, клеток с поверхностями, имеющими большее количество, концентрацию или плотность белков на поверхности, которые больше, чем фоновый сигнал методики, применяемой для измерения поверхностного белка. В конкретных вариантах осуществления, поверхностную экспрессию белка (например, CD57) измеряют методами на основе иммуногистохимии, иммунофлуоресценции или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, количество, частоту или долю клеток, положительных для поверхностной экспрессии, определяют подходящей известной методикой, такой как методика на основе иммуногистохимии, иммунофлуоресценции или

проточной цитометрии.

В конкретных вариантах осуществления, количество, частоту или долю клеток, которые являются отрицательными или положительными для экспрессии белка, например, поверхностной экспрессии, в образце, композиции или популяции, определяют проточной цитометрией. В некоторых вариантах осуществления, белком является CD3, CD4, CD8, CD25, CD27, CD28, CD57, CCR7 или CD45RA. В конкретных вариантах осуществления, белком является CD57.

В конкретных вариантах осуществления, экспрессия белка (например, CD57) в образце, популяции или композиции составляет или включает любой подходящий способ оценки, измерения, определения и/или количественной оценки уровня, количества или концентрации белка. Такие способы включают, но не ограничены ими, определение иммуноанализами, методами аптамера на основе кислоты или белка, ЖХВТ (жидкостной хроматографией высокой точности), пептидным секвенированием (таким как секвенирование с деградацией Эдмана или масс спектрометрией (такой как МС/МС), необязательно в сочетании с ЖХВТ) и адаптациями микрочипа любого из вышеперечисленных (включая чипы нуклеиновой кислоты, антитела или белка-белка (т.е. не антитела)). В некоторых вариантах осуществления, иммуноанализ является или включает способы или анализы, которые определяют белки на основе иммунологической реакции, например, через определение связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела с генным продуктом. Иммуноанализы включают, но не ограничены ими, количественную иммуноцитохимию или иммуногистохимию, ELISA (включая прямой, косвенный, сэндвич-, конкурентный, множественный и портативный ELISA (см., например, патент США № 7,510,687), вестерн-блоттинг (включая одно, двух или более мерный блоттинг или другие хроматографические средства, необязательно, включающие пептидное секвенирование), ферментный иммуноанализ (EIA), RIA (радиоиммуноанализ) и SPR (поверхностный плазмонный резонанс).

В некоторых вариантах осуществления, экспрессию белка или его соответствующего гена измеряют, оценивают или количественно оценивают через измерение иРНК (или кДНК продукта, полученного из иРНК), которая кодирует белок (например, CD57). В конкретных вариантах осуществления, количество или уровень иРНК (или соответствующей кДНК) оценивают, измеряют, определяют и/или количественно оценивают любыми подходящими средствами (ПЦР), включая ПЦР с обратной транскриптазой (от), цифровую капельную ПЦР, методы ПЦР в режиме реального времени и количественную (включая, например, TAQMAN®, молекулярный маяк, LIGHTUP™, SCORPION™, SIMPLEPROBES®; см., например, патенты США №№ 5,538,848; 5,925,517; 6,174,670; 6,329,144; 6,326,145 и 6,635,427); нозерн-блоттинг; саузерн-блоттинг, например, продуктов обратной транскрипции и производных; способами на основе матриц, включая матрицы блоттинга, микроматрицы или синтезированные in situ матрицы; и секвенирование, например, секвенирование синтезом, пиросеквенирование, дидеокси секвенирование или секвенирование лигированием или

любые другие известные методы анализа, такие, как обсуждаются в Shendure et al., Nat. Rev. Genet. 5:335-44 (2004) или Nowrousian, Euk. Cell 9(9): 1300-1310 (2010), включая такие специфические платформы, как HELICOS®, ROCHE® 454, ILLUMINA®/SOLEXA®, ABI SOLiD® и POLONATOR® секвенирование. В некоторых вариантах осуществления, экспрессию иРНК определяют методом секвенирование следующего поколения, такого как РНК секвенирование (РНК-сек.). Методы РНК секвенирования были адаптированы для наиболее распространенных платформ ДНК секвенирования (HiSeq systems (Illumina), 454 Genome Sequencer FLX System (Roche), Applied Biosystems SOLiD (Life Technologies), IonTorrent (Life Technologies)). Эти платформы требуют исходной обратной транскрипции РНК в кДНК. Наоборот, секвенатор отдельной молекулы HeliScope (Helicos BioSciences) способен применять РНК в качестве шаблона для секвенирования.

В некоторых вариантах осуществления, экспрессия белка или его соответствующего гена является или включает эпигенетический анализ белка. В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток оценивают на доступность гена, например, доступность B3GAT1, который кодирует CD57. Эпигенетический анализ может быть проведен любыми подходящими известными средствами, включающими, но не ограниченными ими, анализ транспортаза-доступного хроматина с применением секвенирования (ATAC-сек) для проверки доступности хроматина.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит, содержит примерно или содержит менее чем или примерно 25%, 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% или 0,001%, CD57+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток по существу не содержит CD57+ клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток по существу не содержит CD57+ клетки. В конкретных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит менее чем или примерно 20% CD57+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит менее чем или примерно 10% CD57+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит менее чем или примерно 5% CD57+ клеток. В разных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит менее чем или примерно 1%, 0,1% или 0,01% CD57+ клеток.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит, содержит примерно или содержит по меньшей мере, точно или примерно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,99% или 100% или примерно 100% CD57- Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 80% CD57- Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD57- Т-клеток. В разных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по

меньшей мере, точно или примерно 99%, 99,9% или 99,99% CD57- Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, все или по существу все клетки популяции обогащенных CD57- Т-клеток являются CD57- Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,99% или 100% или примерно 100% CD57-CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 80% CD57- CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD57- CD3+ Т-клеток. В разных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 99%, 99,9% или 99,99% CD57- CD3+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, все или по существу все клетки популяции обогащенных CD57- Т-клеток являются CD57- CD3+ Т-клетками.

В конкретных вариантах осуществления, клетки популяции обогащенных CD57- Т-клеток являются или включают жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления, жизнеспособность клеток оценивают анализом, который может включать, но не ограничен ими, анализы с поступлением красителя (например, анализы кальцеина AM), анализы жизнеспособности XTT-клеток и анализы исключения красителя (например, анализы исключения триптанового синего, Эозина или пропидиевого красителя). В конкретных вариантах осуществления, жизнеспособные клетки имеют отрицательную экспрессию одного или более апоптозных маркеров, например, аннексина V или активной каспазы 3. В некоторых вариантах осуществления, жизнеспособные клетки являются отрицательными для экспрессии одного или более апоптозных маркеров, которые могут включать, но не ограничены ими, каспазу или активную каспазу, например, каспазу 2, каспазу 3, каспазу 6, каспазу 7, каспазу 8, каспазу 9 или каспазу 10, члены семейства Bcl-2, например, Bax, Bad и Bid, Аннексин V или окрашивание TUNEL. В конкретных вариантах осуществления, жизнеспособные клетки являются каспаза 3 отрицательными. В некоторых вариантах осуществления, жизнеспособные клетки являются Аннексин V отрицательными. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 60%, по меньшей мере, точно или примерно 65%, по меньшей мере, точно или примерно 70%, по меньшей мере, точно или примерно 75%, по меньшей мере, точно или примерно 80%, по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99%, по меньшей мере, точно или примерно 99,5%, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% или 100% или примерно 100% клеток популяции обогащенных CD57- Т-клеток являются жизнеспособными клетками. В некоторых вариантах осуществления, жизнеспособные клетки являются или включают жизнеспособные CD3+, жизнеспособные CD4+, жизнеспособные CD8+, жизнеспособные CD57-, жизнеспособные CD57- CD3+,

жизнеспособные CD57-CD4+ или жизнеспособные CD57-CD8+ Т-клетки или комбинацию любых из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, жизнеспособные клетки являются активная каспаза 3 отрицательными. В конкретных вариантах осуществления, жизнеспособные клетки являются Аннексин V отрицательными.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,99% или 100% или примерно 100% CD57-CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 80% CD57- CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57- Т-клеток. В разных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD57- CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, все или по существу все клетки популяции обогащенных CD57- Т-клеток являются CD57- CD4+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,99% или 100% или примерно 100% CD57-CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 80% CD57- CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57- CD8+ Т-клеток. В разных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 95%, CD57- CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, все или по существу все клетки популяции обогащенных CD57- Т-клеток являются CD57- CD8+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,99% или 100% или примерно 100% CD57-CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 80% CD57- CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57- CD3+ Т-клеток. В разных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 95%, CD57- CD3+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, все или по существу все клетки популяции обогащенных CD57- Т-клеток являются CD57- CD3+ Т-клетками.

В конкретных вариантах осуществления, частоту клеток популяции обогащенных CD57- клеток составляют подобные наивным клетки. В некоторых вариантах осуществления, подобными наивным Т-клетками являются Т-клетки, которые являются положительными для экспрессии одного или более маркеров, которые показывают, что

клетки являются наивными и/или являются подобными наивным клетками. В некоторых вариантах осуществления, подобными наивным Т-клетками являются клетки, которые являются положительными для экспрессии маркера, который ассоциирован с наивным или подобным наивным состоянием в Т-клетках. В конкретных вариантах осуществления, подобными наивным Т-клетками являются Т-клетки, которые являются отрицательными для экспрессии одного или более маркеров, которые показывают, что клетки не являются наивными и/или не являются подобными наивным клетками. В некоторых вариантах осуществления, не наивное или не подобное наивному состояние в Т-клетке включает, например, но не ограничено ими, эффекторные Т (T_{EFF}) клетки, Т-клетки памяти, центральные Т-клетки памяти (T_{CM}), эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}) и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки являются положительными для экспрессии, по меньшей мере, одного или более маркеров, которые показывают, что клетки являются наивными и/или являются подобными наивным клетками, и/или ассоциированы с наивным или подобным наивному состоянием в Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления, маркеры экспрессируются на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки являются отрицательными для экспрессии, по меньшей мере, одного или более маркеров, которые показывают, что клетки являются не наивными и/или являются не подобными наивным клетками, и/или ассоциированы с не наивным или не подобным наивному состоянием в Т-клетке.

Маркеры, которые показывают, что Т-клетки являются наивными и/или являются подобными наивным Т-клетками, и/или ассоциированы с не наивным или не подобным наивному состоянием в Т-клетке, включают, но не ограничены ими, CD27, CD28, CD45RA, CD62L и/или CCR7. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки, например, подобные наивным CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, являются положительными для экспрессии CD27, CD28, CD45RA и/или CCR7. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки являются положительными для поверхностной экспрессии одного или более из CD27, CD28, CD45RA и/или CCR7. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки, например, подобные наивным CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, являются отрицательными для экспрессии CD62L. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки, например, подобные наивным CD3+ Т-клетки, являются отрицательными для экспрессии CD62L. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки, например, подобные наивным CD3+, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, являются отрицательными для экспрессии CD62L.

Маркеры, которые показывают, что клетки являются не наивными и/или не подобными наивным Т-клетками, и/или ассоциированы с не наивным или не подобным наивному состоянием в Т-клетке включают, но не ограничены ими, CD25, CD45RO, CD56, KLRG1 и/или CD95. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки, например, подобные наивным CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, являются

отрицательными для экспрессии CD25, CD45RO, CD56 и/или KLRG1. В конкретных вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки, например, подобные наивным CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, имеют низкую экспрессию маркера, ассоциированного с не наивными или не подобными наивным клетками. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки, например, подобные наивным CD3+ Т-клетки, являются отрицательными для экспрессии CD25, CD45RO, CD56 и/или KLRG1. В конкретных вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки, например, подобные наивным CD3+ Т-клетки, имеют низкую экспрессию маркера, ассоциированного с не наивными или не подобными наивным клетками. В конкретных вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки имеют низкую экспрессию CD95. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки являются отрицательными для поверхностной экспрессии одного или более из CD25, CD45RO, CD56 и/или KLRG1.

В некоторых вариантах осуществления, низкая экспрессия маркера, ассоциированного с не наивными или не подобными наивным клетками, равна или включает, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или по меньшей мере, 99% меньшую экспрессию, чем экспрессия маркера в клетках, которые являются не подобными наивным клетками, и/или клетками, которые являются положительными для одного или более маркеров, которые показывают, что клетка является не наивной и/или является не подобной наивным Т-клеткой, и/или ассоциированы с не наивным или не подобным наивному состоянием в Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления, низкая экспрессия маркера, ассоциированного с не наивными или не подобными наивным клетками, равна или включает, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или по меньшей мере, 99% меньшую экспрессию, чем экспрессия маркера в эффекторной Т-клетке (T_{EFF}), Т-клетке памяти, центральной Т-клетке памяти (T_{CM}) и/или эффекторной Т-клетке памяти (T_{EM}).

В некоторых вариантах осуществления, маркеры, которые показывают, что клетка является не наивной и/или является не подобной наивным Т-клеткой, и/или ассоциированы с не наивным или не подобным наивному состоянием в Т-клетке, включают один или более цитокинов. Например, в некоторых вариантах осуществления, не наивные или не подобные наивным Т-клетки являются отрицательными для экспрессии и/или продуцирования одного или более из IL-2, IFN-γ, IL-4 и IL-10. В некоторых вариантах осуществления, секретированы одни или более цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов экспрессированы внутренне не подобными наивным Т-клетками, например, во время или после лечения агентом, который предотвращает, ингибирует или снижает секрецию.

В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки, например,

подобные наивным CD57- Т-клетки, являются положительными для экспрессии, например, поверхностной экспрессии, CD45RA и CCR7. В конкретных вариантах осуществления, подобные наивным CD4+ Т-клетки являются положительными для экспрессии, например, поверхностной экспрессии, CD45RA и CCR7. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным CD8+ Т-клетки являются положительными для экспрессии, например, поверхностной экспрессии, CD45RA и CCR7. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным CD3+ Т-клетки являются положительными для экспрессии, например, поверхностной экспрессии, CD45RA и CCR7. В конкретных вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки являются положительными для экспрессии, например, поверхностной экспрессии, CD45RA, CD27 и CCR7 и являются отрицательными для экспрессии, например, поверхностной экспрессии CD45RO. В конкретных вариантах осуществления, подобные наивным CD4+ Т-клетки являются положительными для экспрессии, например, поверхностной экспрессии, CD45RA, CD27 и CCR7, и являются отрицательными для экспрессии, например, поверхностной экспрессии CD45RO. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным CD8+ Т-клетки являются положительными для экспрессии, например, поверхностной экспрессии, CD45RA, CD27 и CCR7, и являются отрицательными для экспрессии, например, поверхностной экспрессии CD45RO. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным CD3+ Т-клетки являются положительными для экспрессии, например, поверхностной экспрессии, CD45RA, CD27 и CCR7, и являются отрицательными для экспрессии, например, поверхностной экспрессии CD45RO.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% Т-клеток, которые являются положительными для CD25 экспрессии. В разных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% CD57- CD25+ Т-клеток. В разных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит от или от примерно 10% и 60%, 20% и 50% или 25% и 40% CD25+ Т-клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит от или от примерно 10% и 60%, 20% и 50% или 25% и 40% CD57- CD25+ Т-клеток, все включительно.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% Т-клеток, которые являются положительными для CD27 экспрессии. В разных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% CD57- CD27+ Т-клеток. В разных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит от или от примерно 10% и 60%, 20% и 50% или 25% и 40% CD27+ Т-

клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит от или от примерно 10% и 60%, 20% и 50% или 25% и 40% CD57- CD27+ Т-клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 25% CD27+ Т-клеток.

В конкретных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% Т-клеток, которые являются положительными для CD28 экспрессии. В разных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50%CD57- CD28+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит от или от примерно точно или примерно 5% и точно или примерно 50%, точно или примерно 5% и точно или примерно 35% или точно или примерно 10% и точно или примерно 25% CD27+ Т-клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит от или от точно или примерно 5% и точно или примерно 50%, точно или примерно 5% и точно или примерно 35%, или точно или примерно 10% и точно или примерно 25% CD57- CD27+ Т-клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 25% CD27+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% Т-клеток, которые являются положительными для CCR7 экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% CD57- CCR7+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит от или от примерно точно или примерно 5% и точно или примерно 50%, точно или примерно 5% и точно или примерно 35% или точно или примерно 10% и точно или примерно 25% CCR7+Т-клеток, все включительно. В конкретных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит от или от примерно точно или примерно 5% и точно или примерно 50%, точно или примерно 5% и точно или примерно 35% или точно или примерно 10% и точно или примерно 25% CD57- CCR7+ Т-клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 25% CCR7+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% Т-клеток, которые являются положительными для CD45RA экспрессии. В некоторых вариантах осуществления,

популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит, по меньшей мере, точно или примерно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% CD57- CD45RA+Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит от или от примерно точно или примерно 5% и точно или примерно 50%, точно или примерно 5% и точно или примерно 35% или точно или примерно 10% и точно или примерно 25% CD45RA+ Т-клеток, все включительно. В конкретных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- клеток содержит от или от примерно точно или примерно 5% и точно или примерно 50%, точно или примерно 5% и точно или примерно 35% или точно или примерно 10% и точно или примерно 25% CD57- CD45RA+Т-клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 25% CD45RA+Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, частота подобных наивным клеток в истощенной популяции составляет, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше чем или примерно частота подобных наивным клеток в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления, частота одних или более из CD25+ Т-клеток, CD27+ Т-клеток, CD28+ Т-клеток, CCR7+ Т-клеток или CD45RA+ Т-клеток в истощенной популяции составляет, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше чем или примерно частота соответствующих клеток в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления, истощенная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 40% CD27+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, истощенная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 25%, 30%, 35% или 40% CD28+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, истощенная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, истощенная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, истощенная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20% или 25% CCR7+ Т-клеток.

II. СЕЛЕКТИРОВАНИЕ CD57- Т-КЛЕТОК И/ИЛИ ИСТОЩЕНИЕ CD57+ Т КЛЕТОК

В некоторых вариантах осуществления, популяцию обогащенных CD57- Т-клеток получают из биологического образца. В конкретных вариантах осуществления, популяцию обогащенных CD57- Т-клеток выбирают, выделяют или обогащают из биологического образца. В конкретных вариантах осуществления, CD57+ Т-клетки удаляют, отделяют или истощают из биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 99,9% CD57+ Т-клеток удаляют, отделяют или истощают из биологического образца.

В конкретных вариантах осуществления, подмножества клеток, например подмножества Т-клеток, выбирают, выделяют или обогащают из биологического образца до селектирования, выделения или обогащения CD57- Т-клеток из биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, подмножества клеток, например Т-клеток, выбирают, выделяют или обогащают из популяции обогащенных CD57- Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит менее чем 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,1%, 0,01% или 0,001% CD57+ Т-клеток в биологическом образце, например, до селектирования, выделения или обогащения. В конкретных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит менее чем 20% CD57+ Т-клеток биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит менее чем 5% CD57+ Т-клеток биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит менее чем 1% CD57+ Т-клеток биологического образца, например, до селектирования, выделения или обогащения. В разных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит менее чем 0,1% CD57+ Т-клеток биологического образца. В конкретных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток содержит, содержит примерно или содержит менее чем 0,01% CD57+ Т-клеток биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, частота CD57+ Т-клеток в истощенной популяции составляет менее чем или примерно 35%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% или 0,1% от частоты CD57+ Т-клеток в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления, истощенная популяция содержит менее чем или примерно 3%, менее чем или примерно 2%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, истощенная популяция не содержит или по существу не содержит CD57+ Т-клетки.

В конкретных вариантах осуществления, клетки популяции обогащенных CD57- Т-клеток являются менее дифференцированными, чем клетки биологического образца, например, до селектирования, выделения или обогащения. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток имеет большую частоту подобных наивным клеток, чем биологический образец. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57+ Т-клеток включает, включает примерно или включает, по меньшей мере, точно или примерно 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 1-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно или 10-кратно больше подобных наивным клеток, чем биологический образец, например, до селектирования, выделения или обогащения.

В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным клетки включают наивные Т-клетки или центральные Т-клетки памяти. В некоторых вариантах

осуществления, подобные наивным клетки могут включать клетки, положительные или экспрессирующие высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клеток. В некоторых аспектах, клетками являются CD27+. В некоторых аспектах, клетками являются CD28+. В некоторых аспектах, клетками являются CCR7+. В конкретных аспектах, CCR7 экспрессирован наивными или подобными наивным Т-клетками (например, CCR7+CD45RA+ или CCR7+CD27+) и центральными Т-клетками памяти (CCR7+CD45RA-). В некоторых вариантах осуществления, подобными наивным Т-клетками или Т-клетками, которые являются поверхность-положительными для маркера, экспрессированного на подобных наивным Т-клетках, являются CCR7+CD45RA+, если клетками являются CD27+ или CD27-. В некоторых вариантах осуществления, подобными наивным Т-клетками или Т-клетками, которые являются поверхность-положительными для маркера, экспрессированного на подобных наивным Т-клетках, являются CD27+CCR7+, если клетками являются CD45RA+ или CD45RA-. В некоторых вариантах осуществления, подобными наивным Т-клетками или Т-клетками, которые являются поверхность-положительными для маркера, экспрессированного на подобных наивным Т-клетках, являются CD62L-CCR7+. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным клетки включают клетки на ранней стадии дифференциации (например, клетки, которые являются CCR7+CD27+).

В некоторых вариантах осуществления, центральные Т-клетки памяти могут включать клетки на разных стадиях дифференциации и могут быть охарактеризованы положительной или высокой экспрессией (например, поверхностной экспрессией) определенных клеточных маркеров, и/или отрицательной или низкой экспрессией (например, поверхностной экспрессией) других клеточных маркеров. В некоторых аспектах, менее дифференцированные клетки, например центральные клетки памяти, дольше живут и истощаются менее быстро, тем самым повышая жизнестойкость и живучесть. В некоторых аспектах, респондер на клеточную терапию, такую как CAR-Т-клеточная терапия, имеет повышенную экспрессию центральных генов памяти. См., *например,* Fraietta et al. (2018) Nat Med. 24(5):563-571. В некоторых аспектах, центральные Т-клетки памяти характеризуются положительной или высокой экспрессией CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127. В некоторых аспектах, центральные Т-клетки памяти характеризуются отрицательной или низкой экспрессией CD45RA и/или гранзима В. В некоторых вариантах осуществления, центральные Т-клетки памяти или Т-клетки, которые является поверхность-положительными для маркера, экспрессированного на центральных Т-клетках памяти, являются CCR7+CD45RA-.

В конкретных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток включает, включает примерно или включает, по меньшей мере, точно или примерно 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 1-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно или 10-кратно больше CD27+ Т-клеток, чем биологический образец, например, до селектирования, выделения или

обогащения. В конкретных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток включает, включает примерно или включает, по меньшей мере, точно или примерно 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 1-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно или 10-кратно больше CD28+ Т-клеток, чем биологический образец, например, до селектирования, выделения или обогащения. В разных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток включает, включает примерно или включает по меньшей мере, точно или примерно 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 1-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно или 10-кратно больше CD25+ Т-клеток, чем биологический образец, например, до селектирования, выделения или обогащения. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток включает, включает примерно или включает по меньшей мере, точно или примерно 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 1-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно или 10-кратно больше CCR7+ Т-клеток, чем биологический образец например, до селектирования, выделения или обогащения. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- Т-клеток включает, включает примерно или включает, по меньшей мере, точно или примерно 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 1-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно или 10-кратно больше CD45RA+ клеток, чем биологический образец, например, до селектирования, выделения или обогащения.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки, например, CD3+ Т-клетки, выбирают, выделяют или обогащают из биологического образца до селектирования, выделения или обогащения CD57- Т-клеток из биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки, например, CD3+ Т-клетки, выбирают, выделяют или обогащают из популяции обогащенных CD57- Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, селектирование, выделение или обогащение Т-клеток, например CD3+ Т-клеток, включает положительное селектирование клеток из образца.

В некоторых вариантах осуществления, CD57+ клетки выбирают, выделяют или обогащают из образца, клеточной композиции или клеточной популяции, тем самым продуцируя выделенные или селектированные CD57+ клетки и популяцию обогащенных CD57- клеток, например, Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, CD57+ клетки выбирают, выделяют или обогащают из биологического образца, тем самым продуцируя выделенные или селектированные CD57+ клетки и популяцию обогащенных CD57- клеток, например, Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, CD3+Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из популяции обогащенных CD57- клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD57- CD3+ Т-клеток и не селектированную популяцию обогащенных CD57- клеток. В некоторых вариантах осуществления, CD3+Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из не селектированной популяции обогащенных CD57- клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD57-CD3+ Т-

клеток. В разных вариантах осуществления, CD3+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из популяции обогащенных CD57- клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD57- CD3+ Т-клеток и не селектированную популяцию обогащенных CD57- клеток, и затем CD4+ или CD8+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из не селектированной популяции обогащенных CD57- клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток или CD57-CD8+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, подмножества Т-клеток, например, CD4+ или CD8+ Т-клеток, выбирают, выделяют или обогащают из биологического образца до селектирования, выделения или обогащения CD57- Т-клеток из биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, подмножества Т-клеток, например, CD4+ или CD8+ Т-клеток, выбирают, выделяют или обогащают из популяции обогащенных CD57- Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, селектирование, выделение или обогащения подмножества Т-клеток, например CD4+ или CD8+ Т-клеток, включает положительное селектирование клеток из образца.

В некоторых вариантах осуществления, CD57+ клетки выбирают, выделяют или обогащают из образца, клеточной композиции или клеточной популяции, тем самым продуцируя выделенные или селектированные CD57+ клетки и популяцию обогащенных CD57- клеток, например, Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, CD57+ клетки выбирают, выделяют или обогащают из биологического образца, тем самым продуцируя выделенные или селектированные CD57+ клетки и популяцию обогащенных CD57- клеток, например, Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, CD4+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из популяции обогащенных CD57- клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток и не селектированную популяцию обогащенных CD57- клеток. В некоторых вариантах осуществления, CD8+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из популяции обогащенных CD57- клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток и не селектированную популяцию обогащенных CD57- клеток. В некоторых вариантах осуществления, CD8+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из не селектированной популяции обогащенных CD57- клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, CD4+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из не селектированной популяции обогащенных CD57- клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток.

В конкретных вариантах осуществления, CD4+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из популяции обогащенных CD57- клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток и не селектированную популяцию обогащенных CD57- клеток, и затем CD8+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из не селектированной популяции обогащенных CD57- клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток. В разных вариантах осуществления, CD4+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из популяции обогащенных CD57- клеток, тем

самым создавая популяцию обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток и не селектированную популяцию обогащенных CD57- клеток, и затем CD8+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из не селектированной популяции обогащенных CD57- клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток.

В конкретных вариантах осуществления, (1) CD4+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из биологического образца, тем самым создавая популяцию обогащенных CD4+ Т-клеток и не селектированную популяцию обогащенных CD4- клеток;(2) CD8+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из не селектированной популяции обогащенных CD4- клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD8+ Т-клеток; и (3) CD57+ Т-клетки истощают из обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеточных популяций, создавая популяции обогащенных CD57-CD4+ и CD57-CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, (1) CD8+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из биологического образца, тем самым создавая популяцию обогащенных CD8+ Т-клеток и не селектированную популяцию обогащенных CD8- клеток; (2) CD4+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из не селектированной популяции обогащенных CD4- клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD4+ Т-клеток; и (3) CD57+ Т-клетки истощают из обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеточных популяций, создавая популяции обогащенных CD57-CD4+ и CD57-CD8+ Т-клеток.

В конкретных вариантах осуществления, CD4+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из биологического образца, тем самым создавая обогащенную популяцию CD4+ Т-клеток, и затем CD57+ клетки удаляют из обогащенной популяции CD4+ Т-клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, CD8+ Т-клетки обогащают, селектируют или выделяют из биологического образца, тем самым создавая обогащенную популяцию CD8+ Т-клеток, и затем CD57+ клетки удаляют из обогащенной популяции CD8+ Т-клеток, тем самым создавая популяцию обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, одну или более популяций, обогащенных CD57- Т-клетками, замораживают, например, криоконсервируют и/или криозащищают, после выделения, селектирования и/или обогащения. В конкретных вариантах осуществления, популяцию обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток замораживают, например, криоконсервируют и/или криозащищают, после выделения, селектирования и/или обогащения. В некоторых вариантах осуществления, популяцию обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток замораживают, например, криоконсервируют и/или криозащищают, после выделения, селектирования и/или обогащения. В некоторых вариантах осуществления, популяцию обогащенных CD57- CD3+ Т-клеток замораживают, например, криоконсервируют и/или криозащищают, после выделения, селектирования и/или обогащения. В некоторых вариантах осуществления, одну или более популяций, обогащенных Т-клетками, замораживают например, криоконсервируют и/или криозащищают, до любых стадий инкубирования, активации, стимулирования,

конструирования, трансдуцирования, трансфицирования, культивирования, размножения, сбора и/или составления популяции клеток. В конкретных вариантах осуществления, популяцию обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток замораживают например, криоконсервируют и/или криозащищают, до любых стадий инкубирования, активирования, стимулирования, конструирования, трансдуцирования, трансфицирования, культивирования, размножения, сбора и/или составления популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяцию обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток замораживают например, криоконсервируют и/или криозащищают, до любых стадий инкубирования, активирования, стимулирования, конструирования, трансдуцирования, трансфицирования, культивирования, размножения, сбора и/или составления популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяцию обогащенных CD57-CD3+ Т-клеток замораживают например, криоконсервируют и/или криозащищают, до любых стадий инкубирования, активирования, стимулирования, конструирования, трансдуцирования, трансфицирования, культивирования, размножения, сбора и/или составления популяции клеток. В конкретных вариантах осуществления, одну или более криозащищенных входных композиций хранят, например, при или при примерно -80°C, в течение от 12 часов и 7 дней, от 24 часов и 120 часов или от 2 дней и 5 дней. В конкретных вариантах осуществления, одна или более криозащищенных входных композиций хранят при или при примерно -80°C, в течение времени менее чем 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней или 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней или 1 дня. В некоторых вариантах осуществления, одну или более криозащищенных входных композиций хранят при или при примерно -70°C или -80°C в течение менее чем 3 дней, например или примерно 2 дней.

В некоторых вариантах осуществления, “истощение” или “удаление” относительно одного или более конкретных типов клеток или клеточных популяций, относится к снижению количества или доли типа клеток или популяции, например, по сравнению с общим количеством клеток в или объеме композиции или относительно других типов клеток, например, отрицательным селектированием на основе маркеров, экспрессированных популяцией или клетками, или положительным селектированием на основе маркера, не присутствующего на клеточной популяции или клетках, которые необходимо истощать. В общем, термины истощение или удаление не требует полного удаления клеток, типа клеток или популяции из композиции.

В некоторых вариантах осуществления, “обогащение” относительно одного или более конкретных типов клеток или клеточной популяции, относится к повышению количества или доли типа клеток или популяции, например, по сравнению с общим количеством клеток в или объеме композиции или относительно других типов клеток, например, положительным селектированием на основе маркеров, экспрессированных популяцией или клетками, или отрицательным селектированием на основе маркера, не присутствующего на клеточной популяции или клетках, которые необходимо истощать. В общем, термин обогащение не требует полного удаления других клеток, типов клеток или популяций из композиции, и не требует, чтобы обогащенные таким образом клетки

присутствовали в количестве или даже рядом со 100% в обогащенной композиции.

В некоторых аспектах, клеточные популяции или клеточные композиции, полученные от субъекта, такого как субъекта-человека, для клеточной терапии, например адоптивной клеточной терапии, могут демонстрировать низкий рост или медленный рост, так, что они не достигают (например, отсутствие роста) порога для сбора клеток (например, критерия сбора) для создания терапевтической композиции, или не достигают порога для сбора клеток (например, критерия сбора) для создания терапевтической композиции в пределах определенного периода времени (например, медленный рост). В некоторых аспектах, некоторые из таких клеточных популяций могут содержать высокую частоту CD57+ клеток, например, частоту CD57+ выше порогового значения. В других аспектах, клеточные популяции или клеточные композиции, полученные от субъекта, такого как субъект-человек, для клеточной терапии, например адоптивной клеточной терапии, могут демонстрировать улучшенный рост по сравнению с популяциями, демонстрирующими отсутствие роста или медленный рост. В некоторых аспектах, такие клеточные популяции или клеточные композиции могут содержать низкую частоту CD57+ клеток, например, частоту CD57+ клеток менее чем пороговое значение. В некоторых аспектах, клеточные популяции или клеточные композиции, которые демонстрируют улучшенный рост, могут демонстрировать фенотипы или экспрессировать маркеры, ассоциированные с подобными наивным или подобными центральной памяти фенотипами, такими как CD27+, CD28+ и/или CCR7+. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы основаны на наблюдениях, что существует вариабельность или гетерогенность в CD57+ Т-клетках, экспрессированных среди Т-клеток в биологическом образце (например, образце лейкафереза или афереза) от субъектов-людей, которая, в некоторых аспектах, может дать вариабельность в фенотипе и функции сконструированных композиций Т-клеток, полученных для применения в адоптивной клеточной терапии от множества разных субъектов, даже с применением того же производственного процесса. В конкретных вариантах осуществления, представленные способы контролируют или снижают такую вариабельность через селектирование, выделение или обогащение CD57- Т-клеток из биологического образца, например, через удаление, отделение или истощение CD57+ Т-клеток из биологического образца. Такие клетки затем могут применяться в процессах для конструирования или производства клеток для клеточной терапии для минимизации вариабельности среди продуктов, также улучшая характеристики и признаки конкретного продукта, такие как способность к размножению и выживание при введении субъекту.

А. Получение образцов и клеток

В конкретных вариантах осуществления, представленные способы применяют в связи с выделением, селектированием или обогащением клеток из биологического образца для создания одной или более популяций обогащенных клеток, например, CD57- Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы включают выделение клеток или их популяции из биологических образцов, таких, которые получены

из или произведены из субъекта, который имеет конкретное заболевание или состояние или нуждается в клеточной терапии, или которому будет вводиться клеточную терапию. В некоторых аспектах субъектом является человек, такой как субъект, который является пациентом, нуждающимся в определенном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяются, обрабатываются и/или конструируются. Соответственно, клетки в некоторых вариантах осуществления являются первичными клетками, например, первичными клетками человека. Образцы включают образцы тканей, жидкости и другие образцы, взятые непосредственно у субъекта. Биологический образец может представлять собой образец, полученный непосредственно из биологического источника, или образец, который обработан. Биологические образцы включают, но не ограничены ими, биологические жидкости, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая обработанные образцы, полученные из них.

В некоторых аспектах, образцом является кровь или образец крови либо продукт афереза или лейкафереза. Примеры образцов включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, лимфоидную ткань, связанную с кишечником, лимфоидную ткань, связанную со слизистой оболочкой, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почку, поджелудочную железу, грудь, кость, простату, шейку матки, яички, яичники, миндалины или другой орган и/или клетки, полученные из них. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологичных и аллогенных источников. В некоторых вариантах осуществления, образец является или содержит образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), образец нефракционированной Т-клетки, образец лимфоцита, образец белой клетки крови, продукт афереза или продукт лейкафереза.

В некоторых примерах, клетки из кровотока субъекта получают, например, аферезом или лейкаферезом. Образцы, в некоторых аспектах, содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие белые клетки крови, красные клетки крови и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах, содержат клетки, отличные от красных клеток крови и тромбоциты.

В некоторых вариантах осуществления, клетки крови, собранные у субъекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления, клетки промывают физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления, в промывочном растворе отсутствует кальций и/или магний и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах, стадию промывки осуществляют на полуавтоматической «проточной» центрифуге (например, клеточном процессоре Cobe 2991, Baxter) согласно

инструкциям производителя. В некоторых случаях, стадию промывки осуществляют путем тангенциальной проточной фильтрации (TFF) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления, клетки ресуспендируют во множестве биосовместимых буферов после промывки, например, в PBS, не содержащем Ca++/Mg++. В некоторых вариантах осуществления, компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки (например, продукт афереза или продукт лейкафереза), промывают для удаления одного или более антикоагулянтов, таких как гепарин, добавленных во время афереза или лейкафереза.

В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки (например, образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), образец нефракционированной Т-клетки, образец лимфоцита, образец белой клетки крови, продукт афереза или продукт лейкафереза) криоконсервируют и/или криозащищают (например, замораживают), и затем размораживают и необязательно промывают перед любыми стадиями выделения, селектирования, активирования, стимулирования, конструирования, трансдуцирования, трансфицирования, инкубирования, культивирования, сбора, составления популяции клеток и/или введения составленной клеточной популяции субъекту.

В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий аутологичные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от субъекта, собирают способом, подходящим для обеспечения надлежащего качества для производства. В одном аспекте, образец, содержащий PBMC, получен из фракционированной цельной крови. В некоторых вариантах осуществления, цельную кровь субъекта фракционируют лейкаферезом с использованием центробежной силы и различий в плотности между клеточными фенотипами, когда аутологичные мононуклеарные клетки (МНК) предпочтительно обогащены, в то время как другие клеточные фенотипы, такие как красные клетки крови, уменьшены в собранной клеточной композиции. В некоторых вариантах осуществления, во время сбора MNC одновременно собирают аутологичную плазму, что в некоторых аспектах может обеспечить повышенную стабильность продукта лейкафереза. В одном аспекте, аутологичную плазму добавляют к продукту лейкафереза для улучшения буферной способности матрицы продукта лейкафереза. В некоторых аспектах, общий объем цельной крови, обработанной для получения продукта лейкафереза, составляет или составляет примерно 2 л, 4 л, 6 л, 8 л, 10 л, 12 л, 14 л, 16 л, 18 л или 20 л или любое значение между любыми из вышеперечисленных . В некоторых вариантах осуществления, объем собранной аутологичной плазмы составляет или составляет примерно 10 мл, 50 мл, 100 мл, 150 мл, 200 мл, 250 мл или 300 мл или более или представляет собой объем между любыми из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, продукт лейкафереза подвергают процедуре, например, промыванию и составлению для криоконсервации в процессе, в пределах примерно 48 часов после завершения сбора лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, продукт лейкафереза подвергают

одной или более стадиям промывания, например, в течение примерно 2 часов, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов или 48 часов от завершения сбора лейкафереза. В некоторых аспектах, одна или более стадий промывки удаляют антикоагулянт во время сбора лейкафереза, клеточные отходы, которые могли накапливаться в продукте лейкафереза, остаточные тромбоциты и/или клеточный дебрис. В некоторых вариантах осуществления, одну или более замен буфера выполняют во время одной или более стадий промывки.

В конкретных вариантах осуществления продукт афереза или продукт лейкафереза криоконсервируют и/или криозащищают (например, замораживают), а затем размораживают перед тем, как подвергнуть стадии обогащения, селектирования или выделения клеток (например, стадии селектирования или выделения Т-клеток), как описано выше. В некоторых вариантах осуществления, после криоконсервации и/или криозащиты, продукт афереза или продукт лейкафереза подвергают стадии селектирования или выделения Т-клеток, никаких дополнительных стадий криоконсервации и/или криозащиты не выполняют во время или между любыми последующими стадиями, такими как стадии активирования, стимулирования, конструирования, трансдуцирования, трансфицирования, инкубирования, культивирования, сбора, составления популяции клеток и/или введения составленной клеточной популяции субъекту. Например, Т-клетки, выбранные из размороженного криоконсервированного и/или криозащищенного продукта афереза или продукта лейкафереза, снова не криоконсервируют и/или не криозащищают перед размораживанием и необязательно промывают для последующего процесса, такого как активация/стимулирование или трансдукция Т-клеток.

В конкретных вариантах осуществления, продукт афереза или продукт лейкафереза криоконсервируют и/или криозащищают (например, замораживают) при плотности, равной или равной примерно или, по меньшей мере, 5×10^6 клеток/мл, 10×10^6 клеток/мл, 20×10^6 клеток/мл, 30×10^6 клеток/мл, 40×10^6 клеток/мл, 50×10^6 клеток/мл, 60×10^6 клеток/мл, 70×10^6 клеток/мл, 80×10^6 клеток/мл, 90×10^6 клеток/мл, 100×10^6 клеток/мл, 110×10^6 клеток/мл, 120×10^6 клеток/мл, 130×10^6 клеток/мл, 140×10^6 клеток/мл или 150×10^6 клеток/мл или любому значению между любыми из вышеперечисленных, в растворе или буфере для криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления, раствор или буфер для криоконсервирования является или содержит, например, раствор ДМСО, необязательно содержащий сывороточный альбумин человека (HSA) или другую среду, подходящую для замораживания клеток.

В конкретных вариантах осуществления, криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкафереза помещают в банк (например, без селектирования Т-клеток до замораживания образца), что, в некоторых аспектах, может позволить большую гибкость для последующих стадий производства. В некоторых аспектах, криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкафереза аликвотируют в многодозовый контейнер для криоконсервации, такой как

пакеты, каждый из которых может применяться индивидуальном или в комбинации при обработке продукта. Например, если общее количество жизнеспособных клеток в продукте афереза или продукте лейкафереза составляет менее чем 15×10^9 клеток, криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкафереза аликвотируют в четыре контейнера для криоконсервации, такие как пакеты. В некоторых вариантах осуществления, если общее количество жизнеспособных клеток в продукте афереза или продукте лейкафереза составляет $15\text{-}30\times10^9$ клеток, криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкафереза аликвотируют в восемь контейнеров для криоконсервации, таких как пакеты.

В одном аспекте, помещение клеток в банк до селектирования повышает выход клеток в последующем процессе, и более раннее помещение клеток в банк может означать, что они здоровее и могут лучше соответствовать критериям производственного успеха. В другом аспекте, после размораживания, криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкафереза может быть подвергнут одному или более различным способам селектирования. Преимущества этого подхода заключаются, среди прочего, в улучшении доступности, эффективности и/или других аспектов клеток клеточной терапии для лечения заболевания или состояния субъекта, например, донора образца и/или другого реципиента.

В некоторых вариантах осуществления, образец (например, образец афереза или лейкафереза) собирают и криоконсервируют и/или криозащищают до или без предварительного селектирования клеток (например, без предварительного селектирования Т-клеток, такого как селектирование хроматографией), после того как у донора диагностировано заболевание или состояние. В некоторых аспектах, время криоконсервации также наступает до того, как донор получит одно или более из следующего: любое начальное лечение заболевания или состояния, любое таргетное лечение или любое лечение, меченое для лечения заболевания или состояния, или любое лечение кроме радиационной и/или химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления, образец собирают после первого рецидива заболевания после начального лечения заболевания и до того, как донор или субъект получит последующее лечение заболевания. Начальное и/или последующее лечение может быть терапией, отличной от клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, собранные клетки могут применяться в качестве клеточной терапии после начального и/или последующих лечения. В одном аспекте, криоконсервированный и/или криозащищенный образец без предварительного селектирования клеток может помочь снизить первоначальные затраты, например, связанные с не леченными пациентами в рандомизированном клиническом исследовании, которые могут пересечься и потребовать лечения позже.

В некоторых вариантах осуществления, образец (например, образец афереза или лейкафереза) собирают и криоконсервируют и/или криозащищают до или без предварительного селектирования клеток (например, без предварительного селектирования Т-клеток, такого как селектирование хроматографией), после второго

рецидива заболевания после второй линии лечения заболевания и до того, как донор или субъект получат последующее лечение заболевания. В некоторых вариантах осуществления, пациентов идентифицируют как имеющих вероятность рецидива после второй линии лечения, например, путем оценки определенных факторов риска. В некоторых вариантах осуществления, факторы риска основаны на типе заболевания и/или генетике, таких как лимфома с двойным поражением, первичный рефрактерный рак или активированная В-клеточная лимфома. В некоторых вариантах осуществления, факторы риска основаны на клинической картине, такой как ранний рецидив после лечения первой линии или другие плохие прогностические показатели после лечения (например, IPI (Международный прогностический индекс)> 2).

В некоторых вариантах осуществления, образец (например, образец афереза или лейкафереза) собирают и криоконсервируют и/или криозащищают до или без предварительного селектирования клеток (например, без предварительного селектирования Т-клеток, такого как селектирование хроматографией), 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, донором или субъектом может быть здоровый субъект. В определенных случаях, донор или субъект могут быть выбраны для помещения в банк или хранения клеток, не считаясь подверженными риску развития заболевания или не будучи диагностированными как имеющие заболевание в случае, если клеточная терапия потребуется на более позднем этапе жизни. В некоторых вариантах осуществления, донор или субъект может считаться подверженным риску развития заболевания на основе факторов, таких как генетические мутации, генетические аномалии, генетические нарушения, семейный анамнез, белковые аномалии (такие как дефицит продуцирования и/или обработки белка) и выбора стиля жизни, которые могут повысить риск развития заболевания. В некоторых вариантах осуществления, клетками собирают для профилактики.

В некоторых вариантах осуществления, криоконсервированный и/или криозащищенный образец (например, образец афереза или лейкафереза) такой как образец клеток, который не был подвергнут предварительному селектированию клеток (например, без предварительного селектирования Т-клеток, такого как селектирование хроматографией) хранят или помещают в банк в течение периода времени, большего или равного 12 часов, 24 часа, 36 часов или 48 часов, или большего или равного 0,5 дня, одному дню, 1,5 дням или двум дням. В некоторых вариантах осуществления, образец хранят или помещают в банк в течение периода времени, большего или равного 1 неделе, 2 недели, 3 недели или 4 недели. В некоторых вариантах осуществления, образец помещают на долговременное хранение или долговременное посещение в банк. В некоторых аспектах, образец хранят в течение периода времени больше или равного 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяцев, 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.

В некоторых вариантах осуществления, образец афереза или лейкафереза, взятый у донора, отправляется в охлажденной среде в место хранения или обработки, и/или криогенно хранится в месте хранения или обрабатывается в месте обработки. В некоторых вариантах осуществления, перед отправкой образец обрабатывают, например, селектированием Т-клеток, таких как CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, такую обработку проводят после отправки и перед криогенным хранением образца. В некоторых вариантах осуществления, обработку выполняют после размораживания образца после криогенного хранения.

Позволяя донорам хранить свои клетки на стадии, когда доноры и, следовательно, их клетки не прошли обширного лечения 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, полученными после одного или после нескольких циклов лечения. Например, клетки, собранные до одного или более циклов лечения, могут быть более здоровыми, могут демонстрировать более высокие уровни определенных клеточных активностей, могут расти быстрее и/или могут быть более восприимчивыми к генетическим манипуляциям, чем клетки, прошедшие несколько циклов лечения. Другой пример преимущества согласно вариантам осуществления, описанным в настоящем документе, может включать удобство. Например, при сборе, необязательной обработке и хранении донорских клеток до того, как они потребуются для клеточной терапии, клетки станут легко доступными, если и когда они впоследствии понадобятся реципиенту. Это может увеличить емкость лаборатории афереза, предоставляя техническим специалистам большую гибкость при планировании процесса сбора афереза.

Типовые способы и системы для криогенного хранения и обработки клеток из образца, такого как образец афереза, могут включать те, которые описаны в WO2018170188. В некоторых вариантах осуществления, способ и системы включают сбор афереза до того, как пациенту понадобится клеточная терапия, и последующую криоконсервацию образца афереза для последующего использования в процессе конструирования клеток, например Т-клеток, с рекомбинантным рецептором (например, CAR). В некоторых случаях, такие процессы могут включать процессы, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, образец афереза собирают у субъекта и криоконсервируют перед последующим селектированием Т-клеток, активацией, стимулированием, конструированием, трансдукцией, трансфекцией, инкубацией, культивированием, сбором, составлением популяции клеток и/или введением составленной клеточной популяции субъекту. В таких примерах, криоконсервированный образец афереза размораживают перед тем, как подвергнуть образец одной или более стадиям селектирования, например, любым, описанным в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, криоконсервированный и/или

криозащищенный образец клеток (например образец афереза или лейкафереза), такой как образец клеток, который не был подвергнут предварительному селектированию клеток (например, без предварительного селектирования Т-клеток, такого как селектирование хроматографией) оттаивают до его применения в последующих процессах производства клеточной популяции для клеточной терапии, например, Т-клеточной популяции, содержащей CAR+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, такой криоконсервированный и/или криозащищенный образец клеток (например образец афереза или лейкафереза) применяют в связи с процессом в настоящем документе, представленным для конструирования Т-клеточной терапии, такой как CAR+ Т-клеточная терапия. В конкретных примерах, никаких дополнительных стадий криоконсервирования не проводят до или во время стадий сбора/составления.

В некоторых вариантах осуществления, криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкафереза размораживают. В некоторых вариантах осуществления, размороженную клеточную композицию разводят (например, бессывороточной средой) и/или промывают (например, бессывороточной средой), что, в некоторых случаях, может удалить или снизить ненужные или нежелательные компоненты. В некоторых случаях, разведение и/или промывка удаляет или снижает присутствие криопротектора, например ДМСО, содержащегося в размороженном образце, который, в противном случае, может оказать отрицательное воздействие на жизнеспособность клеток, выход, восстановление при длительном воздействии комнатной температуры. В некоторых вариантах осуществления, разведение и/или промывка позволяет сменить среду размороженного криоконсервированного продукта в бессывороточной среде, например, как в PCT/US2018/064627, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит минимальную среду (например, OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium (ThermoFisher) с добавление одной или более добавок. В некоторых вариантах осуществления, одна или более добавок не содержат сыворотку. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит минимальную среду с добавлением одного или более дополнительных компонентов для сохранения, размножения и/или активации клеток (например, Т-клеток), таких, как представлены дополнительной добавкой (например OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (ThermoFisher)). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит добавку для замены сыворотки, например, замену сыворотки иммунных клеток, например, ThermoFisher, #A2596101, CTS™ Immune Cell Serum Replacement или заменитель сыворотки иммунных клеток, описанный у Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит свободную форму аминокислоты, такой 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 более рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный IL-2, рекомбинантный IL-7 человека и/или рекомбинантный IL-15 человека.

B. Селектирование Т-клеток

В некоторых вариантах осуществления, селектирование, выделение или обогащение клеток, например, CD57+ или CD57- клеток (например, CD57+ Т-клеток), включает одну или более стадий приготовления и/или разделения клеток не на основе аффинности. В некоторых примерах, клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или более реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения желательными компонентами, лизирования или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах, клетки разделяют на основе одного или более свойств, таких как плотность, адгерентные свойства, размер, чувствительность и/или резистентность к конкретным компонентам. В некоторых вариантах осуществления, способы включают способы разделения клеток на основе плотности, такие как приготовление белых клеток крови из периферической крови лизированием красных клеток крови и центрифугированием через градиент Перколла или Фиколла. В некоторых вариантах осуществления, способы, методики и реагенты для селектирования, выделения и обогащения описаны, например, в заявках РСТ №№ WO2013124474 и WO2015164675, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей полноте..

В некоторых вариантах осуществления, CD57- клетки выделяют, обогащают или селектируют в процессе или методике, которая включает одну или более стадий селектирования. В некоторых вариантах осуществления, одна или более стадий селектирования является или включает отрицательное селектирование. В некоторых вариантах осуществления, CD57- клетки выделяют, обогащают или селектируют разделением или удалением CD57+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, клеточную популяцию обогащенных CD57- клеток получают отрицательным селектированием CD57+ клеток из популяции.

В некоторых вариантах осуществления, двухвалентное антитело связывает CD57+ клетки с клетками большей плотности или гранулами. Эту технологию применяют наиболее очевидно с красными клетками крови (например RosetteSep™ STEMCELL Technologies) или любую подобную или подходящую технологию для сочетания клеток-мишеней, например, CD57+ Т-клеток, с градиентами плотности для удаления.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть стадии селектирования включает инкубирование клеток с реагентом селектирования. Инкубирование с реагентом или реагентами селектирования, например, как часть способов селектирования, которые могут проводиться с применением одного или более реагентов селектирования для селектирования одного или более разных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в или на клетке одной или более специфических

молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления, такие поверхностные белки могут включать CD57, CD4 или CD8. В некоторых вариантах осуществления, такие поверхностные белки могут включать CD3. В некоторых вариантах осуществления, может применяться любой известный способ с применением реагента или реагентов селектирования для разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления, реагент или реагенты селектирования позволяют разделение, которое является разделением на основе аффинности или иммуноаффинности. Например, селектирование в некоторых аспектах включает инкубирование с реагентом или реагентами для разделения клеток и клеточными популяциями на основе клеточной экспрессии или уровня экспрессии одного или более маркеров, обычно маркеров клеточной поверхности, например, через инкубирование с антителом или партнером связывания, который специфически связывается с такими маркерами, обычно с последующими стадиями промывки и отделения клеток, связанных с антителом или партнером связывания, от таких клеток, которые не связаны с антителом или партнером связывания. В некоторых вариантах осуществления, реагент или реагенты для разделения клеток являются или включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с или распознают CD4, CD8 или CD57. В некоторых вариантах осуществления, реагент или реагенты для разделения клеток являются или включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются или распознают CD3.

В некоторых аспектах таких процессов, объем клеток смешивают с количеством желаемого реагента селектирования на основе аффинности. Селектирование на основе иммуноаффинности может проводиться с применением любой системы или способа, которые дают благоприятное энергетическое взаимодействие между разделяемыми клетками и молекулой, специфически связывающейся с маркером на клетке, например, антителом или другим партнером связывания на твердой поверхности, например, частицу. В некоторых вариантах осуществления, способы проводят с применением частиц, таких как гранулы, например, магнитные гранулы, которые покрыты агентом селектирования (например, антителом), специфическим к маркеру клеток. Частицы (например гранулы) могут быть инкубированы или смешаны с клетками в контейнер, таком как туба или пакет, при встряхивании или перемешивании, с постоянным отношением плотности клеток к частицам (например, гранулам), чтобы помочь в осуществлении энергетически благоприятных взаимодействий. В других случаях способы включают селектирование клеток, где все или часть селектирования осуществляют во внутренней полости центрифужной камеры, например, при центробежном вращении. В некоторых вариантах осуществления, инкубирование клеток с реагентами селектирования, такое как селектирование на основе иммуноаффинности реагентов, проводят в центрифужной камере. В некоторых вариантах осуществления, выделение или разделение проводят с использованием системы, устройства или аппарата, описанных в международной

патентной заявке, номер публикации WO2009/072003 или US 20110003380 A1. А одном примере, системой является система, описанная в международной публикации номер WO2016/073602.

В некоторых вариантах осуществления, путем проведения таких стадий селектирования или их частей (например, инкубирования с частицами, покрытыми антителом, например, магнитными гранулами) в полости центрифужной камеры, пользователь может контролировать определенные параметры, такие как объем различных растворов, добавление раствора во время обработки и регулирование времени, что может дать преимущества по сравнению с другими доступными способами. Например, способность уменьшать объем жидкости в полости во время инкубирования может увеличивать концентрацию частиц (например, гранулированного реагента), используемых в селектировании и, таким образом, химический потенциал раствора, не влияя на общее количество клеток в полости. Это, в свою очередь, может усилить попарные взаимодействия между обрабатываемыми клетками и частицами, используемыми для селектирования. В некоторых вариантах осуществления, проведение этапа инкубирования в камере, например, когда оно ассоциировано с системами, схемами и управлением, как описано в настоящем документе, позволяет пользователю осуществлять перемешивание раствора в течение желаемого времени во время инкубирования, что также может улучшить взаимодействие.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть стадии селектирования выполняют в центрифужной камере, где стадия включает инкубирование клеток с реагентом селектирования. В некоторых аспектах таких процессов, объем клеток смешивают с количеством желаемого реагента селектирования на основе аффинности, которое намного меньше, чем обычно используется при выполнении подобного селектирования в пробирке или контейнере для селектирования того же количества клеток и/или объема клеток согласно инструкции производителя. В некоторых вариантах осуществления, количество реагента или реагентов селектирования составляет не более чем 5%, не более чем 10%, не более чем 15%, не более чем 20%, не более чем 25%, не более чем 50%, не более чем 60%, не более чем 70% или не более чем 80% от количества того же реагента селектирования, применяемого для селектирования клеток инкубированием в пробирке или контейнере для того же количества клеток и/или того же объема клеток согласно инструкции производителя.

В некоторых вариантах осуществления, для селектирования, например, селектирования на основе иммуноаффинности клеток, клетки инкубируют в полости камеры в популяции, которая также содержит буфер селектирования с реагентом селектирования, таким, как молекула, которая специфически связывается с поверхностным маркером на клетке, которую желательно обогатить и/или истощить, но не на другой клетке в популяции, такой как антитело, которое необязательно сопряжено с каркасом, таким как полимер или поверхность, например, гранула, например, магнитная гранула, такая как магнитная гранула, сопряженная с моноклональными антителами,

специфическими для CD4 и CD8. В некоторых вариантах осуществления, для селектирования, например, селектирования на основе иммуноаффинности клеток, клетки инкубируют в полости камеры с популяции, которая также содержит буфер селектирования с реагентом селектирования, таким как молекула, которая специфически связывается с поверхностным маркером на клетке, которую желательно обогатить и/или истощить, но не на другой клетке в популяции, такой как антитело, которое необязательно сопряжено с каркасом, таким как полимер или поверхность, например, гранула, например, магнитная гранула, такая как магнитная гранула, сопряженная с моноклональными антителами, специфическими для CD3. В некоторых вариантах осуществления, как описано, реагент селектирования добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое по существу меньше чем (например, составляет не более чем 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% от количества) по сравнению с количеством реагента селектирования, которое что обычно используется, или которое было бы необходимо для достижения примерно такой же, или подобной эффективности селектирования того же количества клеток или того же объема клеток, когда селектирование осуществляют в пробирке при встряхивании или вращении. В некоторых вариантах осуществления инкубирование проводят с добавлением буфера селектирования к клеткам и реагенту селектирования для достижения целевого объема при инкубировании с реагентом, например, от 10 мл до 200 мл, например, по меньшей мере, или примерно по меньшей мере, или примерно или 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 150 мл или 200 мл. В некоторых вариантах осуществления, буфер селектирования и реагент селектирования предварительно смешивают до добавления к клеткам. В некоторых вариантах осуществления, буфер селектирования и реагент селектирования отдельно добавляют к клеткам. В некоторых вариантах осуществления, селектирование инкубированием проводят при периодическом осторожном перемешивании, которое может помочь в достижении энергетически благоприятных взаимодействий и, тем самым, позволить применить меньше общего реагента селектирования при достижении высокой эффективности селектирования.

В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность инкубирования с реагентом селектирования составляет от или от примерно 5 минут до 6 часов, например, от 30 минут до 3 часов, например, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, 30 минут, 60 минут, 120 минут или 180 минут.

В некоторых вариантах осуществления, инкубирование обычно проводят в условиях смешивания, например, в присутствии вращения, обычно при относительно низком усилии или скорости, например, скорости ниже, чем та, которую применяют для осаждения клеток центрифугированием, например, от или от примерно 600 об./мин. до 1700 об./мин. (например точно или примерно или, по меньшей мере, 600 об./мин., 1000 об./мин. или 1500 об./мин. или 1700 об./мин.), например при RCF на образце или стенке камеры или другого контейнера от или от примерно 80g до 100g (например точно или примерно или, по меньшей мере, 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах

осуществления, вращение осуществляют с применением повторяющихся интервалов вращения при такой низкой скорости с последующим периодом отдыха, например, при вращении и/или отдыхе в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, при вращении в течение приблизительно 1 или 2 секунд с последующим отдыхом в течение приблизительно 5, 6, 7 или 8 секунд.

В некоторых вариантах осуществления, такой процесс проводят в полностью закрытой системе, в которую встроена камера. В некоторых вариантах осуществления, этот процесс (и, в некоторых аспектах, также одна или более дополнительных стадий, таких как стадия предварительной промывки образца, содержащего клетки, такого как образец афереза) проводят в автоматизированном режиме, так что клетки, реагент и другие компоненты впускают и выпускают из камеры в подходящее время и проводят центрифугирование, так, чтобы завершить стадии промывки и связывания в одной закрытой системе с применением автоматизированной программы.

В некоторых вариантах осуществления, после инкубирования и/или смешивания клеток и реагента и/или реагентов селектирования, инкубированные клетки подвергают разделению для селектирования клеток на основе присутствия или отсутствия конкретного реагента или реагентов. В некоторых вариантах осуществления, разделение проводят в той же закрытой системе, в которой проводят инкубирование клеток с реагентом селектирования. В некоторых вариантах осуществления, после инкубирования с реагентами селектирования, инкубированные клетки, включая клетки, в которых реагент селектирования связан, переносят в систему для разделения клеток на основе иммуноаффинности. В некоторых вариантах осуществления, система для разделения на основе иммуноаффинности является или содержит колонку для магнитного разделения.

Такие стадии разделения могут быть основаны на положительном селектировании, при котором клетки, имеющие связанные реагенты, например антитело или партнер связывания, сохраняют для дальнейшего применения, и/или отрицательном селектировании, при котором сохраняют клетки, не связанные с реагентом, например, антителом или партнером связывания. В некоторых примерах, обе фракции сохраняют для дальнейшего применения. В некоторых аспектах, отрицательное селектирование может быть особенно полезным, если не доступно антитело, которое специфически идентифицирует тип клеток в гетерогенной популяции, так, что разделение проводят на основе маркеров, экспрессированных клетками, отличными от желаемой популяции.

В некоторых вариантах осуществления, стадии процесса дополнительно включают отрицательное и/или положительное селектирование инкубированных клеток, например, с применением системы или аппарата, который может проводить селектирование на основе аффинности. В некоторых вариантах осуществления, выделение проводят через обогащение для конкретной клеточной популяции положительным селектированием, или истощение конкретной клеточной популяции отрицательным селектированием. В некоторых вариантах осуществления, положительные или отрицательное селектирование проводят инкубированием клеток с одним или более антителами или другими

связывающими агентами, которые специфически связываются с одним или более поверхностными маркерами, экспрессированными иди экспрессированными (маркер+) на относительно высоком уровне (высокий маркер) на положительно или отрицательно выбранных клетках, соответственно.

Разделение не обязательно должно приводить к 100% обогащению или удалению определенной клеточной популяции или клеток, экспрессирующих определенный маркер. Например, положительное селектирование или обогащение для клеток определенного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к увеличению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Аналогично, отрицательное селектирование, удаление или истощение клеток определенного типа, например, экспрессирующих маркер, относится к уменьшению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток.

В некоторых примерах проводят несколько раундов стадий разделения, где положительно или отрицательно выбранную фракцию с одной стадии подвергают другой стадии разделения, например последующему положительному или отрицательному селектированию. В некоторых примерах, одна стадия разделения может истощить клетки, экспрессирующие несколько маркеров одновременно, например, инкубированием клеток с множеством антител или партнеров связывания, каждый из которых специфичен для маркера, таргетированного для отрицательного селектирования. Аналогично, несколько типов клеток могут быть одновременно положительно селектированы инкубированием клеток с множеством антител или партнеров связывания, экспрессируемых на различных типах клеток. В некоторых вариантах осуществления, стадии разделения повторяют или выполняют более одного раза, где положительно или отрицательно селектированную фракцию с одной стадии подвергают той же стадии разделения, например, повторному положительному или отрицательному селектированию. В некоторых примерах, одну стадию разделения повторяют и/или выполняют более одного раза, например, для повышения чистоты селектированных клеток и/или для дальнейшего удаления и/или истощения отрицательно селектированных клеток из отрицательно селектированной фракции. В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий разделения выполняют два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз или более десяти раз. В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий селектирования выполняют и/или повторяют от одного до десяти раз, от одного до пяти раз или от трех до пяти раз.

Например, в некоторых аспектах, специфические субпопуляции Т-клеток, такие как клетки, положительные или экспрессирующие высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD3+, CD4+, CD8+ или CD57+ Т-клеток, выделяют методами положительного или отрицательного селектирования. В некоторых вариантах осуществления, такие клетки селектируют инкубированием с одним или более антителами или партнерами связывания, которые специфически связываются с такими маркерами. В

некоторых вариантах осуществления, антитело или партнер связывания может быть конъюгирован, прямо или косвенно, с твердой подложкой или матрицей для проведения селектирования, такой как магнитная гранула или парамагнитная гранула. Например, в некоторых вариантах осуществления, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или CD57+ Т-клетки могут быть селектированы, например, положительно селектированы с CD4 Microbeads, CD8 Microbeads или CD57 Microbeads (Miltenyl Biotec). Например, в некоторых вариантах осуществления, CD3+ Т-клетки могут быть селектированы, например, положительно селектированы, с CD3 Microbeads (Miltenyl Biotec).

В некоторых вариантах осуществления, CD57- клетки отделяют от образца PBMC отрицательным селектированием клеток, положительных для CD57 экспрессии. В разных вариантах осуществления, Т-клетки отделяют от образца PBMC отрицательным селектированием маркеров, экспрессированных на не Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие белые клетки крови, такие как CD14. В некоторых аспектах, стадию CD3+ селектирования применяют для отделения Т-клеток от не Т-клеток. Такая популяция CD3+ может быть дополнительно отсортирована на субпопуляции положительным или отрицательным селектированием для CD4+ или CD8+, и/или маркеров, экспрессированных или экспрессированных в относительно высокой степени на одной или более субпопуляциях подобных наивным, памяти и/или эффекторных Т-клеток. В некоторых аспектах, стадию CD4+ или CD8+ селектирования применяют для отделения CD4+ хелпера и CD8+ цитотоксической Т-клетки. Такие CD4+ и CD8+ популяции могут быть дополнительно отсортированы на субпопуляции положительным или отрицательным селектированием для маркеров, экспрессированных или экспрессированных в относительно высокой степени на одной или более субпопуляциях подобных наивным, памяти и/или эффекторных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, CD8+ клетки дополнительно обогащают или истощают CD57- Т-клетками, например, положительным или отрицательным селектированием на основе поверхностной экспрессии CD57. В некоторых вариантах осуществления, CD4+ клетки дополнительно обогащают или истощают CD57- Т-клетками, например, положительным или отрицательным селектированием на основе поверхностной экспрессии CD57. В некоторых вариантах осуществления, CD3+ клетки дополнительно обогащают или истощают CD57- Т-клетками, например, положительным или отрицательным селектированием на основе поверхностной экспрессии CD57.

В некоторых вариантах осуществления, CD8+ клетки дополнительно обогащают или истощают наивными, центральными памяти, эффекторными памяти и/или центральными памяти стволовыми клетками, например, положительным или отрицательным селектированием на основе поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующими субпопуляциями. В некоторых вариантах осуществления, обогащение центральными Т-клетками памяти (TCM) проводят для повышения эффективности, например, для улучшения долговременного выживания, размножения и/или приживления после введения, что, в некоторых аспектах, особенно надежно в таких субпопуляциях. См.

Terakura et al., (2012) Blood, 1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В некоторых вариантах осуществления, объединение TCM-обогащенных CD8+ Т-клеток и CD4+ Т-клеток дополнительно улучшает эффективность.

В некоторых аспектах, ту же стадию селектирования на основе экспрессии CD4 применят при получении CD8+ клеточной популяции или субпопуляции, также применяют для создания CD4+ клеточной популяции или субпопуляции, так, чтобы обе, положительная и отрицательная фракции после разделения на основе CD4, сохранялись и применялись на следующих стадиях способов, необязательно, после одной или более дополнительных стадий положительного или отрицательного селектирования. В некоторых вариантах осуществления, селектирование для CD4+ клеточной популяции и селектирование для CD8+ клеточной популяции проводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления, селектирование для CD4+ клеточной популяции и селектирование для CD8+ клеточной популяции проводят последовательно, в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления, способы селектирования клеток могут включать такие, которые описаны в опубликованной заявке США № US20170037369. В некоторых вариантах осуществления, селектированная CD4+ клеточная популяция и селектированная CD8+ клеточная популяция могут быть объединены после селектирования. В некоторых аспектах, селектированная CD4+ клеточная популяция и селектированная CD8+ клеточная популяция могут быть объединены в мешке биореактора как описано в настоящем документе.

В разных вариантах осуществления, биологический образец, например, образец PBMC или других белых клеток крови, подвергают селектированию CD57+ Т-клеток, где отрицательные фракции, содержащие обогащенные CD57- клетки, сохраняют. В некоторых вариантах осуществления, отрицательную фракцию, обогащенную CD57-клетками, подвергают селектированию CD3+ Т-клеток, где положительную фракцию сохраняют. В некоторых вариантах осуществления, CD8+ Т-клетки выбирают из отрицательной фракции, обогащенной CD57- клетками. В некоторых вариантах осуществления, отрицательную фракцию, обогащенную CD57- клетками, подвергают селектированию CD8+ Т-клеток, где обе, отрицательную и положительную фракции, сохраняют. В некоторых вариантах осуществления, CD4+ Т-клетки селектируют из отрицательной фракции. В конкретных вариантах осуществления, отрицательную фракцию, обогащенную CD57- клетками, подвергают селектированию CD4+ Т-клеток, где обе, отрицательную и положительную фракции, сохраняют. В некоторых вариантах осуществления, CD8+ Т-клетки селектируют из отрицательной фракции.

В некоторых аспектах, инкубированный образец или популяцию клеток, предназначенную для разделения, инкубируют с реагентом селектирования, содержащим мелкие намагничиваемые или чувствительные к магниту частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные гранулы (например, такие как Dynalbeads или MACS® гранулы). Чувствительный к магниту материал, например, частицы, обычно прямо или косвенно присоединены к партнеру связывания, например, антителу, которое специфически

связывается с молекулой, например, поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которую желательно разделить, например, которую желательно отрицательно или положительно селектировать. В некоторых аспектах, агент селектирования является или включает парамагнитную гранулу и присоединенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с или распознает CD3, CD4, CD8 или CD57. В некоторых вариантах осуществления, агентом селектирования является CD3, CD4, CD8 или CD57 MACS® микрогранула.

В некоторых вариантах осуществления, магнитная частица или гранула содержит чувствительный к магниту материал, связанный со специфическим членом связывания, таким как антитело или другой партнер связывания. Известно множество материалов, чувствительных к магниту, для применения в способах магнитного разделения, например, такие, которые описаны у Molday, в патенте США № 4,452,773 и в описании европейского патента EP 452342 B, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки. Частицы коллоидного размера, такие как описаны у Owen в патенте США № 4,795,698 и у Liberti et al., в патенте США № 5,200,084 также могут применяться.

Инкубирование обычно проводят в условиях, в которых антитела или партнеры связывания или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты, которые специфически связываются с такими антителами или партнерами связывания, которые присоединены в магнитной частице или грануле, специфически связываются с молекулами клеточной поверхности, если присутствуют на клетках в образце.

В некоторых вариантах осуществления, чувствительные к магниту частицы покрывают первичными антителами или другими партнерами связывания, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления, магнитные частицы присоединены к клеткам через покрытие первичными антителами, специфическими к одному или более маркерам. В некоторых вариантах осуществления, клетки, отличные от гранул, метят первичным антителом или партнером связывания, и затем добавляют покрытые специфическим к типу клетки вторичным антителом или другим партнером связывания (например, стрептавидином) магнитные частицы. В некоторых вариантах осуществления, покрытые стрептавидином магнитные частицы применяют в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

В некоторых аспектах, разделение проводят с помощью процедуры, в которой образец помещают в магнитное поле, и клетки, имеющие прикрепленные к ним чувствительные к магниту или намагничиваемые частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от не меченых клеток. Для положительного селектирования сохраняют клетки, которые притягиваются к магниту; для отрицательного селектирования сохраняют клетки, которые не привлекаются (не меченые клетки). В некоторых аспектах комбинацию положительного и отрицательного селектирования выполняют на одной и той же стадии селектирования, на которой положительную и отрицательную фракции сохраняют и далее обрабатывают или подвергают дополнительным стадиям разделения.

В некоторых вариантах осуществления, селектирование на основе аффинности проходит через магнитно-активированный клеточный сортинг (MACS) (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Системы магнитно-активированного клеточного сортинга (MACS), например, CliniMACS, способны к селектированию клеток с высокой чистотой, которые имеют присоединенные к ним магнитные частицы. В некоторых вариантах осуществления, MACS работает в режиме, в котором частицы, не являющиеся и являющиеся мишенями, последовательно элюируют после применения внешнего магнитного поля. То есть клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, в то время как не прикрепленные частицы элюируются. Затем, после завершения первой стадии элюирования, частицы, которые были захвачены магнитным полем и не могли быть элюированы, освобождаются некоторым образом, так что они могут быть элюированы и восстановлены. В некоторых вариантах осуществления клетки, не являющиеся мишенями, метят и истощают из гетерогенной популяции клеток. В разных вариантах осуществления, агентом селектирования являются CD3, CD4, CD8 или CD57 MACS® микрогранулы.

В некоторых вариантах осуществления, субоптимальная выходная концентрация аффинного реагента является концентрацией ниже концентрации, используемой или необходимой для достижения оптимального или максимального выхода связанных клеток в данном селектировании или обогащении, включающем инкубирование клеток с реагентом и восстановление или разделение клеток, связанных с реагентом («выход», например, является количеством клеток, со-восстановленных или селектированных, по сравнению с общим количеством клеток в инкубировании, которые таргетированы реагентом, или к которым реагент специфичен, или которые имеют маркер, к которому реагент специфичен и с которым способен связываться). Субоптимальной выходной концентрацией обычно является концентрация или количество реагента, которое в таком процессе или стадии достигает менее чем все, например, не более 70% выхода связанных клеток, например, CD57+, CD4+ или CD8+ Т-клеток, после восстановления клеток, связанных с реагентом. В некоторых вариантах осуществления, субоптимальной выходной концентрацией обычно является концентрация или количество реагента, которое в таком процессе или стадии достигает менее чем все, например, не более 70% выхода связанных клеток, например, CD3+ Т-клеток, при восстановлении клеток, связанных с реагентом. В некоторых вариантах осуществления, не более чем точно или примерно 50%, 45%, 40%, 30% или 25% выхода достигается субоптимальной концентрацией аффинного реагента. Концентрация может быть выражена в единицах количества или массы частиц или поверхностей на клетку и/или количества или массы молекул агента (например, антитела, например, фрагмента антитела) на клетку.

В некоторых вариантах осуществления, например, при работе с субоптимальной выходной концентрацией для каждого или одного или более из двух или более реагентов селектирования с аффинностью к CD57+, CD4+ или CD8+ Т-клеткам, один или более таких реагентов используют в концентрации, которая выше, чем для одного или более

других таких реагентов, чтобы изменить соотношение типа клетки, распознаваемого этим реагентом, по сравнению с типом клетки, распознаваемым другим. В некоторых вариантах осуществления, например, при работе с субоптимальной выходной концентрацией для каждого или одного или более из двух или более реагентов селектирования с аффинностью к CD57+, CD3+, CD4+ или CD8+ Т-клеткам, один или более таких реагентов используют в концентрации, которая выше, чем для одного или более других таких реагентов, чтобы изменить соотношение типа клетки, распознаваемого этим реагентом, по сравнению с типом клетки, распознаваемым другим. Например, реагент, который специфически связывается с маркером, для которого желательно изменить соотношение, может быть включен в концентрации (например, агента или массы на клетку), которая увеличивается в половину, 1-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно, 10-кратно или более, по сравнению с другими, в зависимости от того, насколько желательно увеличить соотношение. В некоторых вариантах осуществления, при работе в субоптимальном диапазоне и/или при достаточном количестве клеток для достижения насыщения реагентов, количество иммуноаффинного реагента пропорционально приблизительному выходу обогащенных клеток. В некоторых вариантах осуществления, подходящее количество или концентрация иммуноаффинных реагентов, которые зависят от желаемого соотношения созданной популяции, содержащей обогащенные или селектированные клетки, например, CD57-, CD4+ или CD8+ Т-клетки, могут быть определены в обычном порядке. В некоторых вариантах осуществления, подходящее количество или концентрация иммуноаффинных реагентов, которые зависят от желаемого соотношения созданной популяции, содержащей обогащенные или селектированные клетки, например, CD3+ Т-клетки, могут быть определены в обычном порядке.

В некоторых вариантах осуществления, стадии разделения и/или выделения проводят с использованием магнитных гранул, в которых иммуноаффинные реагенты обратимо связаны, например, через взаимодействие пептидного лиганда с мутеином стрептавидина, как описано в WO 2015/164675. Примером таких магнитных гранул являются Streptamers®. В некоторых вариантах осуществления, стадии разделения и/или проводят с использованием магнитных гранул, таких как коммерчески доступные от Miltenyi Biotec.

В некоторых вариантах осуществления, чувствительные к магниту частицы остаются прикрепленными к клеткам, которые затем инкубируют, культивируют и/или конструируют; в некоторых аспектах, частицы остаются прикрепленными к клеткам для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления, намагничивающиеся или чувствительные к магниту частицы, удаляют из клеток. Способы удаления намагничивающихся частиц из клеток известны и включают, например, использование конкурирующих не меченых антител, намагничивающихся частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами, и т.д. В некоторых вариантах осуществления, намагничивающиеся частицы являются биоразлагаемыми.

В некоторых вариантах осуществления, выделение и/или селектирование дает одну

или более популяций обогащенных Т-клеток, например, CD57- Т-клеток, CD3+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, две или более популяций обогащенных Т-клеток выделяют, селектируют, обогащают или получают из одного биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, отдельные популяции выделяют, селектируют, обогащают и/или получают из отдельных биологических образцов, собранных, взятых и/или получаемых от одного и того же субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, выделение и/или селектирование дает одну или более популяций обогащенных Т-клеток, которые включают, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% CD57- CD3+ Т-клеток. В конкретном варианте осуществления, популяция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD57- CD3+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, выделение и/или обогащение дает популяции обогащенных CD4+ Т-клеток, которые включают, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% CD57- CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, входная композиция CD4+ Т-клеток включает менее чем 40%, менее чем 35%, 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% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD57- CD4+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, выделение и/или обогащение дает популяции обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток, которые включают, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% CD57- CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция CD8+ Т-клеток содержит менее чем 40%, менее чем 35%, 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% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD57- CD8+ Т-клеток.

C. Селектирование клеток хроматографией

В аспектах способов, представленных в настоящем документе, клеток из образца,

например, Т-клетки, выбирают хроматографическим выделением, таким как колоночная хроматография, включая аффинную хроматографию или гель-проникающую хроматографию. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, CD57-Т-клетки, выделяют, выбирают или обогащают хроматографическим выделением, например, колоночной хроматографией, включая аффинную хроматографию или гель-проникающую хроматографию. В некоторых вариантах осуществления, способ применяет рецептор-связывающий реагент, который связывается с рецепторной молекулой (например, CD57), которая расположена на поверхности клетки-мишени, такой как выделенная, селектированная или обогащенная клетка (например, CD57+ клетка). Такие способы могут быть описаны как (бесследовая) технология клеточной аффинной хроматографии (CATCH) и может включать любой из способов или методов, описанных в заявках PCT №№ WO2013124474 и WO2015164675, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей полноте. В конкретных вариантах осуществления, CD57+ клетки отрицательно селектируют хроматографическим выделением.

В некоторых вариантах осуществления, клетки-мишени (например, CD57+ клетки), имеют или экспрессируют рецепторную молекулу на клеточной поверхности, так, что клетка, которую выделяют, селектируют или обогащают, определяется присутствием, по меньшей мере, одной общей специфической рецепторной молекулой (например, CD57). В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетку-мишень, также может содержать дополнительные клетки, которые лишены рецепторной молекулы. Например, в некоторых вариантах осуществления, Т-клетку выделяют, обогащают или выбирают из образца, содержащего множество типов клеток, например, красных клеток крови или В-клеток. В некоторых вариантах осуществления, CD57+ клетки выделяют, обогащают или выбирают из образца, содержащего множество типов клеток, например, красных клеток крови или В-клеток, тем самым получая выделенные CD57+ клетки и не селектированную популяцию клеток, например, популяцию обогащенных CD57- Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий реагент, содержится в хроматографической колонке, например, связан прямо или косвенно с матрицей для хроматографии (например, стационарной фазой). В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий реагент, присутствует на матрице для хроматографии (например, стационарной фазе) во время добавления образца в колонку. В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий реагент способен связываться косвенно с матрицей для хроматографии (например, стационарной фазой) через реагент, например, аффинный реагент, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, аффинный реагент связан ковалентно или не ковалентно со стационарной фазой колонки. В некоторых вариантах осуществления, аффинный реагент обратимо иммобилизован на матрице для хроматографии (например, стационарной фазе). В некоторых случаях, аффинный реагент иммобилизован на матрице для хроматографии (например, стационарной фазе) через ковалентные связи. В некоторых аспектах, аффинный реагент обратимо иммобилизован на матрице для хроматографии

(например, стационарной фазе) не ковалентно.

В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий реагент может присутствовать, например связываться прямо (например, ковалентно или не ковалентно) или косвенно через аффинный реагент, на матрице для хроматографии (например, стационарной фазе) во время добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). Таким образом, при добавлении образца, клетки-мишени могут быть связаны рецептор-связывающим реагентом и иммобилизован на матрице для хроматографии (например, стационарной фазе) колонки. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий реагент может быть добавлен к образцу. Таким образом, рецептор-связывающий реагент связывается с клетками-мишенями (например, Т-клетками) в образце, и затем образец может быть добавлен к матрице для хроматографии (например, стационарной фазе), содержащей аффинный реагент, где рецептор-связывающий реагент, уже связанный м клеткой-мишенью, связывается с аффинным реагентом, тем самым иммобилизуя клетку-мишень на матрице для хроматографии (например, стационарной фазе). В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий реагент связывается с аффинным реагентом, как описано в настоящем документе, например как описано в настоящем документе, через партнера связывания C, как описано в настоящем документе, содержащемся в рецептор-связывающем реагенте.

В некоторых аспектах, рецептор-связывающий реагент добавляют к образцу. В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий реагент имеет сайт связывания B, который специфически связывается с рецепторной молекулой на поверхности клетки, например, клетки-мишени. В некоторых аспектах, рецептор-связывающий реагент также включает партнер связывания C, который может специфически и обратимо связываться с сайтом связывания Z аффинного реагента. Например, в определенных аспектах, рецептор-связывающий реагент, который связывается или распознает CD57, добавляют к образцу, который связывается с CD57 на поверхности клеток, положительных для CD57 экспрессии в сайте связывания B.

В определенных аспектах, аффинный реагент также может сдержать один или более сайтов связывания Z, которые могут быть связаны партнером связывания C, тем самым обеспечивая мультимеризацию рецептор-связывающего реагента. Этот аффинный реагент, применяемый в настоящем документе, также может быть реагентом мультимеризации. Аффинный реагент, например, может быть стрептавидином, мутеином стрептавидина, авидином, мутеином авидина или их смесью. В некоторых аспектах, разные матрицы хроматографии сопряжены с разными аффинными реагентами, и могут быть нанесены слоями на колонку, образуя мультикомпонентную систему для разделения.

В некоторых вариантах осуществления, два или более рецептор-связывающих реагентов ассоциируют с, например, обратимо или необратимо связываются с, аффинным реагентом, например, через один или множество сайтов связывания Z, присутствующих на аффинном реагенте. В некоторых случаях, это приводит к тому, что рецептор-

связывающие реагенты близко расположены друг к другу так что может возникнуть эффект авидности, если клетки-мишени, имеющие (по меньшей мере, две копии) молекулы клеточной поверхности (например, маркер селектирования), находятся в контакте с рецептор-связывающим реагентом, который способен связывать конкретную молекулу (например, маркер селектирования).

В некоторых вариантах осуществления, два или более разных рецептор-связывающих реагентов, которые являются одинаковыми, т.е. имеют одинаковую специфичность связывания к маркеру селектирования, могут быть обратимо связаны с аффинным реагентом. В некоторых вариантах осуществления, возможно применять, по меньшей мере, два разных рецептор-связывающих реагентов и, в некоторых случаях, три или четыре разных рецептор-связывающих реагента, которые связываются с разными маркерами селектирования. В некоторых аспектах, каждый из, по меньшей мере, двух рецептор-связывающих реагентов может связываться с разными молекулами (например, маркерами селектирования), такими как первая молекула, вторая молекула и так далее. В некоторых случаях, разные молекулы (например, маркеры селектирования), такие как молекулы клеточной поверхности, могут присутствовать на одной и той же клетке-мишени. В других случаях, разные молекулы (например, маркеры селектирования), такие как молекулы клеточной поверхности, могут присутствовать на разных клетках-мишенях, которые присутствуют в одной и той же популяции клеток. В некоторых случаях, третий, четвертый и так далее рецептор-связывающие реагенты могут быть ассоциированы с одним и тем же реагентом, где каждый содержит дополнительный другой сайт связывания.

В некоторых вариантах осуществления, два или более разных рецептор-связывающих реагентов содержат один и тот же партнер связывания C. В некоторых вариантах осуществления, два или более разных рецептор-связывающих реагента содержат разные партнеры связывания. В некоторых аспектах, первый рецептор-связывающий реагент может иметь партнер связывания C1, который может специфически связываться с сайтом связывания Z1, присутствующим на аффинном реагенте, и второй рецептор-связывающий реагент может иметь партнер связывания C2, который может специфически связываться с сайтом связывания Z1 или с сайтом связывания Z2, присутствующим на аффинном реагенте. Таким образом, в некоторых случаях, множество сайтов связывания Z, содержащихся в аффинном реагенте, включает сайты связывания Z1 и Z2, которые способны обратимо связываться с партнерами связывания C1 и C2, соответственно, содержащимися в рецептор-связывающем реагенте. В некоторых вариантах осуществления, C1 и C2 являются одинаковыми, и/или Z1 и Z2 являются одинаковыми. В других аспектах, один или более из множества сайтов связывания Z могут быть разными. В других случаях, один или более из множества партнеров связывания C могут быть разными. В компетенции специалиста в данной области техники находится выбор любой комбинации разных партнеров связывания C, которые совместимы с аффинным реагентом, содержащим сайты связывания Z, пока каждый из

партнеров связывания C способен взаимодействовать, например, специфически связываться, с одним из сайтов связывания Z.

В некоторых вариантах осуществления образец, например, образец, содержащий клетки и рецептор-связывающий реагент (например антитело), загружают на или подвергают контакту с матрицей для хроматографии, содержащей присоединенный или иммобилизованный аффинный реагент (например, связывающий реагент). В конкретных аспектах, аффинный реагент имеет множество сайтов связывания Z, которые специфически связываются с партнером связывания C рецептор-связывающего реагента. В определенных аспектах, рецептор-связывающий реагент связывается с аффинным реагентом через взаимодействие между партнером связывания C и сайтом связывания Z. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, клетка, например, клетка-мишень, иммобилизована через комплекс, которые образован одним или более сайтами связывания Z аффинного реагента и сайтом связывания Z рецептор-связывающего реагента на матрице для хроматографии. В других аспектах, клетка, например, клетка-мишень, может быть истощена из образца, например, ополаскиванием, выделением или вымыванием оставшегося образца из матрицы для хроматографии. В конкретных аспектах, рецептор-связывающий реагент либо может быть включен в образец, который содержит клетки, либо может быть нанесен или введен в контакт с матрицей для хроматографии для связывания с присоединенным реагентом аффинности или мультимеризации, например, до добавления образца к матрице для хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления, матрицу для хроматографии применяют для удаления или отделения клеток-мишеней из образца, например, отрицательным селектированием. Например, в некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий CD57+ клетки и CD57- клетки, контактируют или инкубируют с рецептор-связывающим реагентом, который связывается с и распознает CD57. В некоторых вариантах осуществления, образец и рецептор-связывающие реагенты загружены в матрицу, где, в некоторых аспектах, комплекс образуется иммобилизованным или присоединенным аффинным реагентом, рецептор-связывающим реагентом и CD57+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, несвязанные клетки удаляют или вымывают из матрицы для хроматографии, тем самым удаляя связанные CD57+ клетки и получая образец, например, популяции, обогащенной CD57- клетками.

В некоторых вариантах осуществления, матрицу для хроматографии применяют для выделения, селектирования или обогащения клеток-мишеней из образца, например, положительным селектированием. Например, в некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий CD4+ или CD8+ Т-клетки и другие клетки, например, не иммунные Т-клетки, контактируют или инкубируют с рецептор-связывающим реагентом, который связывается с и/или распознает CD4 или CD8. В некоторых вариантах осуществления, образец и рецептор-связывающие реагенты загружают в матрицу, где, в некоторых аспектах, комплекс образуется иммобилизованным или присоединенным аффинным реагентом, рецептор-связывающим реагентом и CD4+ или CD8+ Т-клетками. В некоторых

вариантах осуществления, несвязанные клетки удаляют или вымывают из матрицы для хроматографии. В конкретных вариантах осуществления, иммобилизованные CD4+ или CD8+ клетки могут быть удалены или выделены добавлением конкурирующего реагента, например, разрушением комплекса. В некоторых аспектах, отделенные, выделенные или элюированные CD4+ или CD8+ Т-клетки таким образом являются образцом, композицией или популяцией клеток, обогащенных CD4+ или CD8+ Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления, матрицу для хроматографии применяют для выделения, селектирования или обогащения клеток-мишеней из образца, например, положительным селектированием. Например, в некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий CD3+ Т-клетки и другие клетки, например, не иммунные Т-клетки, контактируют или инкубируют с рецептор-связывающим реагентом, который связывается с и/или распознает CD3. В некоторых вариантах осуществления, образец и рецептор-связывающие реагенты загружают в матрицу, где, в некоторых аспектах, комплекс образуется иммобилизованным или присоединенным аффинным реагентом, рецептор-связывающим реагентом и CD3+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, несвязанные клетки удаляют или вымывают из матрицы для хроматографии. В конкретных вариантах осуществления, иммобилизованные CD3+ клетки могут быть удалены или выделены добавлением конкурирующего реагента, например, разрушением комплекса. В некоторых аспектах, отделенные, выделенные или элюированные CD3+ Т-клетки таким образом являются образцом, композицией или популяцией клеток, обогащенных CD3+ Т-клетками.

В некоторых аспектах, конкурирующий реагент загружают в хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления, обратимая связь образуется между партнером связывания C и сайтом связывания Z, которая может быть разорвана конкурирующим реагентом. В конкретных вариантах осуществления, конкурирующий реагент имеет сайт связывания, который способен связываться с сайтом связывания Z аффинного реагента. В некоторых вариантах осуществления, конкурирующим реагентом может быть биотин, производное биотина или аналог стрептавидин-связывающего пептида, способного конкурировать за связывание с партнером связывания C для одного или более сайтов связывания Z. В некоторых вариантах осуществления, конкурирующий реагент образует комплекс с аффинным реагентом и поэтому иммобилизован на матрице для хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, партнер связывания C и конкурирующий реагент являются разными, и конкурирующий реагент демонстрирует более высокую аффинность связывания для одного или более сайтов связывания Z по сравнению с аффинностью партнера связывания. В конкретных аспектах любых из способов, представленных в настоящем документе, добавление конкурирующего реагента к стационарной фазе хроматографической колонки для разрыва связывания агента селектирования (например, рецептор-связывающего агента) к аффинному реагенту не требуется для отделения клеток-мишеней (например, Т-клеток) от матрицы для хроматографии (например, стационарной фазы).

В результате такого конкурентного связывания, связывание между рецептор-связывающим реагентом и аффинным реагентом на партнере связывания C и сайте связывания Z замещается. В конкретных вариантах осуществления, добавление или загрузка конкурирующего реагента в матрицу для хроматографии с присоединенным комплексом, содержащим аффинный реагент, рецептор-связывающий реагент и клетку, например, клетку-мишень, элюирует клетку из матрицы для хроматографии. В некоторых аспектах, рецептор-связывающий реагент имеет низкую аффинность в отношении рецепторной молекулы клетки на сайте связывания B, так, что рецептор-связывающий реагент диссоциирует из клетки в присутствии конкурирующего реагента. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, клетки, например, клетки-мишени, элюируют из матрицы для хроматографии, не содержащей или по существу не содержащей связанные рецептор-связывающие молекулы.

В некоторых вариантах осуществления, собирают образец элюирования из элюата первой хроматографической колонки, который включает клетки, например, клетки-мишени, конкурирующий реагент и рецептор-связывающий реагент. В некоторых вариантах осуществления, образец элюирования загружают во вторую хроматографическую колонку, которая имеет подходящую стационарную фазу, которая является и матрицей для аффинной хроматографии и, одновременно, может действовать как матрица для гель-проникающей хроматографии. В конкретных вариантах осуществления, матрица для аффинной хроматографии имеет иммобилизованный на ней аффинный реагент. В некоторых аспектах, рецептор-связывающий реагент и конкурирующий реагент связаны с сайтом связывания Z на аффинном реагенте и поэтому иммобилизованы на матрице для хроматографии. В результате, в определенных аспектах, образец элюирования, содержащий выделенные клетки-мишени, истощают рецептор-связывающим реагентом и конкурирующим реагентом. Таким образом, в некоторых аспектах, клетка-мишень, освобожденная от любых реагентов, находится теперь в состоянии для дальнейшего применения, например, для обработки любым из способов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, клетки-мишени из образца, могут быть истощены из образца, например, промыванием, выделением или вымыванием оставшегося образца из матрицы для хроматографии (например, стационарной фазы). В некоторых вариантах осуществления, одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6) стадий промывания применяют для удаления несвязанных клеток и дебриса из матрицы для хроматографии (например, стационарной фазы). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, проводят две стадии промывания. В некоторых вариантах осуществления, образцу позволяют проникнуть в матрицу в течение, по меньшей мере, или примерно 5, 10, 15, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100 или 120 минут до проведения одной или более стадий промывания. В некоторых вариантах осуществления, стадию промывания проводят, примерно или, по меньшей мере, через 5, 10, 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, стадию промывания проводят, примерно или, по меньшей мере, через 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий промывания проводят в пределах или в пределах примерно 120, 100, 90, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий промывания проводят в пределах или в пределах примерно 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий промывания проводят в пределах или в пределах примерно 5-60 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий промывания проводят в пределах или в пределах примерно 5-50 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий промывания проводят в пределах или в пределах примерно 5-40 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий промывания проводят в пределах или в пределах примерно 5-30 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий промывания проводят в пределах или в пределах примерно 5-20 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий промывания проводят в пределах или в пределах примерно 5-10 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий промывания проводят в пределах или в пределах примерно 10-60 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий промывания проводят в пределах или в пределах примерно 20-60 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий промывания проводят в пределах или в пределах примерно 30-60 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий промывания проводят в пределах или в пределах примерно 40-60 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий промывания проводят в пределах или в пределах примерно 50-60 минут после добавления образца в хроматографическую колонку (например, стационарную фазу).

В некоторых вариантах осуществления, проводят множество раундов стадий селектирования клеток, где положительно или отрицательно селектированые фракции из одной стадии подвергают другой стадии селектирования, например последующему положительному или отрицательному селектированию. В некоторых вариантах осуществления, способы, методы и реагенты для селектирования, выделения и обогащения описаны, например, в заявке PCT № WO2015164675, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки во всей полноте.

В некоторых вариантах осуществления, одна стадия селектирования может применяться для выделения клеток-мишеней (например, CD57- Т-клеток) из образца. В некоторых вариантах осуществления, одна стадия селектирования может быть проведена на одной хроматографической колонке. В некоторых примерах, одна стадия селектирования может истощить клетки, экспрессирующие множество маркеров одновременно. Также, множество типов клеток могут быть положительно селектированы одновременно. В некоторых вариантах осуществления, стадии селектирования повторяют и/или проводят более одного раза, где положительно или отрицательно селектированные фракции с одной стадии повергают одной и той же стадии селектирования, например, повторяющемуся положительному или отрицательному селектированию. В некоторых примерах, одну стадию селектирования повторяют и/или проводят более одного раза, например, для повышения чистоты селектированных клеток и/или для дальнейшего удаления и/или истощения отрицательно селектированных клеток из отрицательно селектированной фракции. В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий селектирования проводят два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз или более десяти раз. В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий селектирования проводят и/или повторяют от одного до десяти раз, от одного до пяти раз или от трех до пяти раз. В некоторых вариантах осуществления, выполняют две стадии селектирования.

Селектирование клеток может проводиться с применением одной или более хроматографических колонок. В некоторых вариантах осуществления, одна или более хроматографических колонок включены в закрытую систему. В некоторых вариантах осуществления, закрытой системой является автоматизированная закрытая система, например, требующая минимального или отсутствия вмешательства пользователя (например, человека). В некоторых вариантах осуществления, селектирование клеток проводят последовательно (например, методом последовательного селектирования). В некоторых вариантах осуществления, одна или более хроматографических колонок расположены последовательно. Например, первая колонка может быть ориентирована так, что выход колонки (например, элюент) может быть загружен, например, через соединительную трубку, во вторую хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления, множество хроматографических колонок могут быть расположены последовательно. В некоторых вариантах осуществления, селектирование клеток может быть достигнуто проведением последовательных стадий положительного и

отрицательного селектирования, где на последующей стадии отрицательную и/или положительную фракцию с предыдущей стадии подвергают дальнейшему селектированию, где весь процесс проводят в одной и той же трубке или комплекте трубок.

В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному селектированию, при котором первое селектирование проводят для обогащения одной из CD4+ или CD8+ популяций, и не селектированные клетки после первого селектирования применяют в качестве источника клеток для второго селектирования для обогащения другой из CD4+ или CD8+ популяций. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения субпопуляций одной или более из CD4+ или CD8+ популяции, например, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному селектированию, при котором первое селектирование проводят для обогащения CD3+ популяции, и селектированные клетки применяют в качестве источника клеток для второго селектирования для обогащения для CD3+ популяций. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному селектированию, при котором первое селектирование проводят для обогащения для CD3+ популяции на первой стационарной фазе (например, в первой хроматографической колонке) и поток, содержащий несвязанные клетки, применяют в качестве источника клеток для второго селектирования для обогащения для CD3+ популяции на второй стационарной фазе (например, во второй хроматографической колонке), где первая и вторая стационарные фазы расположены последовательно. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения субпопуляций CD3+ популяции, например, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток, положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному селектированию, при котором первое селектирование проводят для обогащения для CD3+ популяции, и селектированные клетки применяют в качестве источника клеток для второго селектирования для обогащения для CD4+ популяций. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения субпопуляций CD3+CD4+ популяции, например, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток, положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+,

CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному селектированию, при котором первое селектирование проводят для обогащения для CD3+ популяции и выбранные клетки применяют в качестве источника клеток для второго селектирования для обогащения для CD8+ популяций. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для субпопуляций CD3+CD8+ популяции, например, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток, положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. Предполагается, что в некоторых аспектах, специфические субпопуляции Т-клеток (например, CD3+ клеток), например, клеток положительных или экспрессирующих один или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клеток, селектированы методами положительного или отрицательного последовательного селектирования.

В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному селектированию, при котором первое селектирование проводят для обогащения для CD57- популяции, и выбранные клетки применяют в качестве источника клеток для второго селектирования для обогащения для CD3+ популяций. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному секвенированию, при котором первое селектирование проводят для обогащения для CD57- популяции на первой стационарной фазе (например, в первой хроматографической колонке) и поток, содержащий несвязанные клетки, применяют в качестве источника клеток для второго селектирования для обогащения для CD3+ популяции на второй стационарной фазе (например, во второй хроматографической колонке), где первая и вторая стационарные фазы расположены последовательно. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для субпопуляций CD57- популяции, например, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному секвенированию, при котором первое селектирование проводят для обогащения для CD57- популяции, и выбранные клетки применяют в качестве источника клеток для второго селектирования для обогащения для CD3+ популяций. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для субпопуляций CD57-CD3+ популяции, например, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+,

CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. Предполагается, что в некоторых аспектах, специфические субпопуляции Т-клеток (например, CD57- клеток), такие как клетки, положительные или экспрессирующие один или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клетки, выбирают методами положительного или отрицательного последовательного селектирования.

В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному секвенированию, при котором первое селектирование проводят для обогащения для CD3+ популяции, и выбранные клетки применяют в качестве источника клеток для второго селектирования для обогащения для CD57- популяций. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному секвенированию, при котором первое селектирование проводят для обогащения для CD3+ популяции на первой стационарной фазе (например, в первой хроматографической колонке) и поток, содержащий несвязанные клетки, применяют в качестве источника клеток для второго селектирования для обогащения для C57- популяции на второй стационарной фазе (например, во второй хроматографической колонке), где первая и вторая стационарные фазы расположены последовательно. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для субпопуляций CD3+ популяции, например, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному секвенированию, при котором первое селектирование проводят для обогащения для CD3+ популяции и выбранные клетки применяют в качестве источника клеток для второго селектирования для обогащения для CD57- популяций. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для субпопуляций CD3+CD57- популяции, например, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. Предполагается, что в некоторых аспектах, специфические субпопуляции Т-клеток (например, CD57- клеток), такие как клетки, положительные или экспрессирующие один или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, и/или CD45RO+ Т-клетки, выбирают методами положительного или отрицательного последовательного селектирования.

В некоторых вариантах осуществления, селектирование клеток проводят параллельно (например, методом параллельного селектирования). В некоторых вариантах осуществления, одна или более хроматографических колонок расположены параллельно.

Например, две или более колонок могут быть расположены так, что образец загружают в две или более колонок одновременно через комплект трубок, который позволяет добавлять образец в каждую колонку, например, без необходимости пропускать образец через первую колонку. Например, с применением метода параллельного селектирования, селектирование клеток может проходить при одновременном проведении стадий положительного и/или отрицательного селектирования, например в закрытой системе, где весь процесс провозят в одной и той же трубке или комплекте трубок. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельному селектированию, при котором образец загружают в две или более хроматографических колонок, когда в каждой колонке проводится селектирование клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, две или более хроматографических колонок осуществляют селектирование CD57-, CD3+, CD4+ или CD8+ популяций индивидуально. В некоторых вариантах осуществления, две или более хроматографических колонок, включающих аффинную хроматографию или гель-проникающую хроматографию, независимо осуществляют селектирование одной и той же клеточной популяции. Например, две или более хроматографических колонок могут осуществлять селектирование CD57- клеток. В некоторых вариантах осуществления, две или более хроматографических колонок, включающих аффинную хроматографию или гель-проникающую хроматографию, независимо осуществляют селектирование разных клеточных популяций. Например, две или более хроматографических колонок независимо могут осуществлять селектирование CD57- клеток, CD4+ клеток, CD3+ и/или CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования, например с применением методов последовательного селектирования, может быть проведено для обогащения субпопуляций одной или всех клеточных популяций, выбранных через параллельное селектирование. Например, селектированные клетки могут быть далее селектированы для центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельному селектированию, в котором параллельное селектирование проводят для обогащения для CD57- популяции на двух или более колонках. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для субпопуляций CD57- популяции, например, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельному селектированию, в котором селектирование проводят для обогащения для CD57- популяции и CD3+ популяции на двух или более колонках, независимо. В некоторых вариантах осуществления,

дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для субпопуляций CD57- и CD3+ популяций, например, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельному селектированию, в котором селектирование проводят для обогащения для CD57- популяции и CD4+ популяции на двух или более колонках, независимо. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для субпопуляций CD57- и CD4+ популяций, например, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельному селектированию, в котором параллельное селектирование проводят для обогащения для CD57- популяции и CD8+ популяции. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для субпопуляций CD57- и CD8+ популяций, например, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}) клеток, наивных Т-клеток и/или клеток положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельному селектированию, в котором параллельное селектирование проводят для обогащения для CD4+ популяция и CD8+ популяции. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для субпопуляций CD4+ и CD8+ популяций, например, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток положительных для или экспрессирующих высокие уровни одного или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. Предполагается, что в некоторых аспектах, специфические субпопуляции Т-клеток (например, CD3+, CD4+, CD8+ Т-клеток), такие как клетки, положительные или экспрессирующие один или более поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клетки, селектируют методами положительного или отрицательного параллельного селектирования. В некоторых вариантах осуществления, методы последовательного и параллельного селектирования могут применяться в комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, две колонки применяют для параллельного селектирования. В некоторых вариантах осуществления, две колонки селектируют для одного и того же типа клеток (например, того же маркера селектирования). В некоторых вариантах осуществления, каждая из двух колонок селектируют для CD57- Т-клеток.

В общем, связывающая емкость стационарной фазы (например, селектирующей смолы) влияет на то, сколько потребуется стационарной фазы для селектирования определенного количества групп-мишеней, например, клеток-мишеней, таких как Т-клетки. Связывающая емкость, *например*, количество клеток-мишеней, которое может быть иммобилизовано на мл стационарной фазы (например, селектирующей смолы), может применяться для определения или контроля количества захваченных клеток-мишеней на одной или более колонках. Одна или более хроматографических колонок могут быть использованы для селектирования и стимулирования клеток в колонке, описанных в настоящем документе. Если применяют множество колонок, они могут быть расположены последовательно, параллельно или в подходящей комбинации. Таким образом, связывающая емкость стационарной фазы (например, селектирующей смолы) может применяться для стандартизации количества реагента при одноколоночном подходе, или количества реагента для каждой колонки при многоколоночном подходе.

В некоторых вариантах осуществления, связывающая емкость стационарной фазы, применяемая в настоящем документе, является максимальным количеством клеток-мишеней, связанных со стационарной фазой при данном растворителе и условиях концентрации клеток, где избыток клеток-мишеней загружают в стационарную фазу. В некоторых вариантах осуществления, связывающая емкость составляет или составляет примерно 100 миллионов ± 25 миллионов клеток-мишеней (например, Т-клеток) на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, статическая связывающая емкость стационарной фазы (например, селектирующей смолы), описанная в настоящем документе, варьируется от примерно 75 миллионов до примерно 125 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы. В одном аспекте, связывающая емкость стационарной фазы, применяемая в настоящем документе для селектирования и стимулирования клеток на колонке является статической связывающей емкостью. В некоторых вариантах осуществления, статическая связывающая емкость является максимальным количеством клеток, способных к иммобилизации на стационарной фазе, например, при определенном растворителе и условиях концентрации клеток. В некоторых вариантах осуществления, статическая связывающая емкость стационарной фазы (например, селектирующая смола), описанная в настоящем документе, варьируется от примерно 50 миллионов до примерно 100 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, статическая связывающая емкость составляет или составляет примерно 100 миллионов ± 25 миллионов клеток-мишеней (например, Т-клеток) на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, статическая связывающая емкость стационарной фазы (например, селектирующая смола) описанная в настоящем документе, варьируется от примерно 75 миллионов до примерно 125 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, статическая связывающая емкость стационарной фазы (например, селектирующая смола) составляет от примерно 10 миллионов до примерно 20 миллионов, от примерно 20 миллионов до примерно 30 миллионов, от примерно 30 миллионов до примерно 40 миллионов, от примерно 40

миллионов до примерно 50 миллионов, от примерно 50 миллионов до примерно 60 миллионов, от примерно 60 миллионов до примерно 70 миллионов, от примерно 70 миллионов до примерно 80 миллионов, от примерно 80 миллионов до примерно 90 миллионов, от примерно 90 миллионов до примерно 100 миллионов, от примерно 110 миллионов до примерно 120 миллионов, от примерно 120 миллионов до примерно 130 миллионов, от примерно 130 миллионов до примерно 140 миллионов, от примерно 140 миллионов до примерно 150 миллионов, от примерно 150 миллионов до примерно 160 миллионов, от примерно 160 миллионов до примерно 170 миллионов, от примерно 170 миллионов до примерно 180 миллионов, от примерно 180 миллионов до примерно 190 миллионов или от примерно 190 миллионов до примерно 200 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы.

В некоторых вариантах осуществления, связывающая емкость стационарной фазы, применяемая в настоящем документе, является количеством клеток-мишеней, которые связываются со стационарной фазой в данных условиях потока, до наступления значительного прорыва несвязанных клеток-мишеней. В одном аспекте, связывающая емкость стационарной фазы, применяемая в настоящем документе для селектирования клеток на колонке, является динамической связывающей емкостью, т.е., связывающей емкостью в рабочих условиях в упакованной хроматографической колонке во время внесения образца. В некоторых вариантах осуществления, динамическую связывающую емкость определяют загрузкой образца, содержащего известную концентрацию клеток-мишеней до отслеживания сквозного протекания, и клетки-мишени будут связывать стационарную фазу до определенного момента проскока до того, как несвязанные клетки-мишени будут протекать через колонку. В некоторых вариантах осуществления, динамическая связывающая емкость составляет или составляет примерно 100 миллионов ± 25 миллионов клеток-мишеней (например, Т-клеток) на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, динамическая связывающая емкость стационарной фазы (например, селектирующей смолы), описанной в настоящем документе, составляет от или составляет от примерно 75 миллионов до примерно 125 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, динамическая связывающая емкость стационарной фазы (например, селектирующей смолы), описанной в настоящем документе, варьируется от примерно 50 миллионов до примерно 100 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы. В некоторых вариантах осуществления, динамическая связывающая емкость стационарной фазы (например, селектирующей смолы) составляет от примерно 10 миллионов до примерно 20 миллионов, от примерно 20 миллионов до примерно 30 миллионов, от примерно 30 миллионов до примерно 40 миллионов, от примерно 40 миллионов до примерно 50 миллионов, от примерно 50 миллионов до примерно 60 миллионов, от примерно 60 миллионов до примерно 70 миллионов, от примерно 70 миллионов до примерно 80 миллионов, от примерно 80 миллионов до примерно 90 миллионов, от примерно 90 миллионов до примерно 100 миллионов, от примерно 110 миллионов до примерно 120 миллионов, от

примерно 120 миллионов до примерно 130 миллионов, от примерно 130 миллионов до примерно 140 миллионов, от примерно 140 миллионов до примерно 150 миллионов, от примерно 150 миллионов до примерно 160 миллионов, от примерно 160 миллионов до примерно 170 миллионов, от примерно 170 миллионов до примерно 180 миллионов, от примерно 180 миллионов до примерно 190 миллионов или от примерно 190 миллионов до примерно 200 миллионов клеток-мишеней на мл стационарной фазы.

В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза составляет 20 мл. В некоторых вариантах осуществления, стационарная фаза имеет связывающую емкость 2 миллиарда ± 0,5 миллиарда клеток.

В общем, хроматографическим способом является флюидная хроматография, обычно жидкостная хроматография. В некоторых аспектах, хроматография может проводиться в проточном режиме, при котором жидкий образец, содержащий клетки, например, клетки-мишени, подают, например, самотеком или насосом на одном конце колонки, содержащей матрицу для хроматографии, и при котором жидкий образец выходит из колонки с другого конца колонки. Кроме того, хроматография может проводиться в режиме «вверх и вниз», при котором жидкий образец, содержащий клетки, которые необходимо изолировать, наносят, например, пипеткой, на один конец колонки, содержащей матрицу для хроматографии, упакованный в наконечнике пипетки, и при котором жидкий образец поступает и выходит из матрицы для хроматографии/наконечника пипетки на другом конце колонки. Альтернативно, хроматография также может проводиться в периодическом режиме, при котором хроматографический материал (стационарную фазу) инкубируют с образцом, содержащим клетки, например, при встряхивании, вращении или повторяющемся контакте и удалении жидкого образца, например, с помощью пипетки.

В некоторых аспектах, в качестве матрицы для хроматографии в контексте изобретения может использоваться любой материал, если этот материал подходит для хроматографического выделения клеток. В конкретных аспектах, подходящий материал для хроматографии является по меньшей мере, безвредным или по существу безвредным, например, не вредящим жизнеспособности клеток, при использовании в хроматографической колонке в желаемых условиях для выделения клеток и/или разделения клеток. В некоторых аспектах, матрица для хроматографии остается в заранее определенном месте, обычно в заранее определенном положении, тогда как положение разделяемого образца и компонентов, включенных в настоящий документ, изменяется. Таким образом, в некоторых аспектах, матрицей для хроматографии является «стационарная фаза».

Обычно соответствующая матрица для хроматографии имеет форму твердой или полутвердой фазы, тогда как образец, содержащий клетки-мишени для выделения/разделения является жидкой фазой. Подвижная фаза, используемая для хроматографического разделения, также является жидкой фазой. Матрицей для хроматографии может быть материал в виде частиц (любого подходящего размера и

формы) или монолитный хроматографический материал, включая бумажный субстрат или мембрану (см. раздел «Примеры»). Таким образом, хроматография может быть как колоночной хроматографией, так и плоскостной хроматографией. В дополнение к стандартным хроматографическим колонкам, колонки с двунаправленным потоком или наконечниками пипеток могут использоваться для колоночного/проточного режима хроматографического разделения клеток, как описано здесь. Таким образом, в некоторых случаях наконечники для пипеток или колонки, позволяющие двунаправленный поток, также включены в хроматографические колонки, используемые в настоящих способах. В некоторых аспектах, используют материал матрицы в виде частиц, и материал матрицы в виде частиц, например, может иметь средний размер частиц от примерно 5 мкм до примерно 200 мкм, от примерно 5 мкм до примерно 400 мкм или от примерно 5 мкм до примерно 600 мкм. В некоторых аспектах, используют плоскостную хроматографию, и материалом матрицы может быть любой материал, подходящий для плоскостной хроматографии, такой как обычные мембраны на основе целлюлозы или органического полимера (например, бумажная мембрана, мембрана из нитроцеллюлозы или мембрана из поливинилидендифторида (ПВДФ)) или стеклянные пластины с покрытием из диоксида кремния. В одном варианте осуществления, матрицей для хроматографии/стационарной фазой является не магнитный материал или не намагничиваемый материал.

В некоторых аспектах, матрицей для хроматографии/стационарной фазой является не магнитный материал или не намагничиваемый материал. Такой материал может включать дериватизированный диоксид кремния или поперечно-сшитый гель. Поперечно-сшитый гель (который обычно производится в форме гранул) может быть основан на природном полимере, таком как поперечно-сшитый полисахарид. Пример полисахаридной матрицы включает, но не ограничивается ими, агарозный гель (например, агарозу Superflow™ или материал Sepharose®, такой как Superflow ™ Sepharose®, которые коммерчески доступны с различными размерами гранул и пор) или гель из поперечно-сшитого декстрана(ов). Другим иллюстративным примером является матрица из частиц поперечно-сшитой агарозы, с которой ковалентно связан декстран, которая коммерчески доступна (с различными размерами гранул и с различными размерами пор) как Sephadex® или Superdex®, обе доступны от GE Healthcare. Другим иллюстративным примером такого хроматографического материала является Sephacryl®, который также доступен с различными размерами гранул и пор от GE Healthcare.

В некоторых вариантах осуществления, поперечно-сшитый гель также может быть на основе синтетического полимера, такого как класс полимеров, не встречающихся в природе. Подходящие примеры включают, но не ограничены ими, агарозные гели или гель поперечно-сшитого декстрана(ов). Поперечно-сшитый гель также может быть на основе синтетического полимера, т.е. на классе полимеров, не встречающихся в природе. Обычно такой синтетический полимер, на котором основана хроматографическая стационарная фаза для разделения клеток, является полимером, который имеет полярные мономерные единицы и, следовательно, сам по себе является полярным. Таким образом, в

некоторых случаях такой полярный полимер является гидрофильным. Гидрофильные молекулы, также называемые липофобными, в некоторых аспектах, содержат группы, которые могут образовывать диполь-дипольные взаимодействия с молекулами воды. Как правило, гидрофобные молекулы, также называемые липофильными, имеют тенденцию отделяться от воды.

Иллюстративными примерами подходящих синтетических полимеров являются полиакриламид(ы), стирол-дивинилбензольный гель и сополимер акрилата и диола или акриламида и диола. Иллюстративным примером является полиметакрилатный гель, коммерчески доступный как Fractogel®. Еще одним примером является сополимер этиленгликоля и метакрилата, коммерчески доступный как Toyopearl®. В некоторых вариантах осуществления, хроматографическая стационарная фаза также может включать природные и синтетические полимерные компоненты, такие как композитная матрица или композит или сополимер полисахарида и агарозы, например композит полиакриламид/агароза или полисахарид и N, N'-метиленбисакриламид. Иллюстративным примером сополимера декстрана и N, N'-метиленбисакриламида является вышеупомянутый ряд материалов Sephacryl®. Дериватизированный диоксид кремния может включать частицы диоксида кремния, связанные с синтетическим или природным полимером. Примеры таких вариантов осуществления включают, но не ограничиваются ими, диоксид кремния с привитым полисахаридом, диоксид кремния с привитым поливинилпирролидоном, диоксид кремния с привитым полиэтиленоксидом, диоксид кремния с поли(2-гидроксиэтиласпартамидом) и диоксид кремния с привитым поли(N-изопропилакриламидом).

Матрица для хроматографии, используемая в настоящем изобретении, в некоторых вариантах осуществления представляет собой матрицу для гель-фильтрации (также известную как эксклюзионная), например, при использовании в картридже для удаления, как описано в настоящем документе. Гель-фильтрация может быть охарактеризована тем свойством, что она предназначена для того, чтобы, по меньшей мере, по существу, не взаимодействовать с разделяемыми клетками. Следовательно, эксклюзионная матрица позволяет разделять клетки или другие биологические вещества, как определено в настоящем документе, в основном на основе их размера. Соответствующая матрица для хроматографии обычно представляет собой пористый материал в виде частиц, как упомянуто выше. Матрица для хроматографии может иметь определенный эксклюзионный предел, который обычно определяется в терминах молекулярной массы, при превышении которой полностью исключается проникновение молекул в поры. Соответствующая молекулярная масса, определяющая эксклюзионный предел, может быть выбрана так, чтобы она была ниже массы, соответствующей массе выделяемой клетки-мишени (или биологического вещества). В таком варианте клетка-мишень не попадает в поры эксклюзионной матрицы для хроматографии. Точно так же, стационарная фаза, которая является матрицей для аффинной хроматографии, может иметь поры, размер которых меньше размера выбранной клетки-мишени. В иллюстративных

вариантах осуществления, матрица для аффинной хроматографии и/или эксклюзионная матрица имеет средний размер пор от 0 до примерно 500 нм.

Другие компоненты, присутствующие в образце, такие как рецептор-связывающие молекулы или конкурирующий реагент, могут иметь размер, который ниже эксклюзионного предела пор, и могут входить в поры эксклюзионной матрицы для хроматографии. Из таких компонентов, которые могут частично или полностью проникать в объем пор, более крупные молекулы с меньшим доступом к объему пор обычно элюируются первыми, тогда как самые мелкие молекулы элюируются последними. В некоторых вариантах осуществления, эксклюзионный предел эксклюзионной матрицы для хроматографии выбирают так, чтобы он был ниже максимальной ширины клетки-мишени. Следовательно, компоненты, которые имеют доступ к объему пор, обычно дольше остаются в эксклюзионной матрице для хроматографии, чем клетки-мишени. Таким образом, клетки-мишени могут быть собраны в элюате хроматографической колонки отдельно от других веществ/компонентов образца. Поэтому такие компоненты, как рецептор-связывающий реагент или, где применимо, конкурирующий реагент, элюируются в более поздний момент времени из эксклюзионной матрицы, чем клетки-мишени. Этот эффект разделения будет еще больше увеличиваться, если экслюзионная матрица для хроматографии содержит аффинный реагент (обычно ковалентно связанный с ней), который содержит сайт связывания, например сайт связывания Z, который способен связывать реагенты, такие как рецептор-связывающий реагент и/или конкурирующий реагент, присутствующие в образце. Рецептор-связывающий реагент и/или конкурирующий реагент будет связан сайтами связывания Z аффинного реагента и, таким образом, иммобилизован на матрице для гель-проникающей хроматографии. Этот способ обычно осуществляют в съемном картридже, используемом в настоящем изобретении, и в некоторых вариантах осуществления, способ, комбинация и набор согласно изобретению включают и/или используют такую матрицу для гель-фильтрации. В соответствующем способе клетки соответственно разделяются по размеру.

Матрица для хроматографии, используемая в настоящем изобретении, может также включать в себя магнитно притягиваемое вещество, такое как одна или более магнитно притягиваемых частиц или феррожидкость. Соответствующая магнитно притягиваемая частица может включать реагент мультимеризации или аффинный реагент с сайтом связывания, который способен связывать клетку-мишень. Магнитно притягиваемые частицы могут содержать диамагнитный, ферромагнитный, парамагнитный или суперпарамагнитный материал. Суперпарамагнитный материал реагирует на магнитное поле с индуцированным магнитным полем без образования постоянной намагниченности. Магнитные частицы на основе оксида железа, например, коммерчески доступны как Dynabeads® от Dynal Biotech, как магнитные MicroBeads от Miltenyi Biotec, как магнитные пористые стеклянные гранулы от CPG Inc., а также из разных других источником, таких как Roche Applied Science, BIOCLON, BioSource International Inc., Micromod, AMBION, Merck, Bangs Laboratories, Polysciences или Novagen Inc., если назвать лишь несколько.

Магнитные частицы на основе суперпарамагнитного Co и FeCo, а также нанокристаллы ферромагнитного Co описаны, например, у Hütten, A. et al. (J. Biotech. (2004), 112, 47-63). Однако, в некоторых вариантах осуществления, матрица для хроматографии, применяемая в настоящем изобретения, не содержит какое-либо магнитно притягиваемое вещество.

Рецептор-связывающий реагент

Как описано выше, в определенных аспектах, способы, представленные в настоящем документе, применяют рецептор-связывающий реагент. В некоторых вариантах осуществления, реагентом, описанным в этом разделе, является рецептор-связывающий реагент. В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий реагент связывается с молекулой на поверхности клетки, такой как молекула клеточной поверхности. В некоторых случаях, молекулой клеточной поверхности является маркер селектирования. В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий реагент способен специфически связываться с маркером селектирования, экспрессированным одной или более клетками в образце. В некоторых вариантах осуществления, ссылка на специфическое связывание с молекулой, такой как молекула клеточной поверхности или рецептор клеточной поверхности, в настоящем описании, не обязательно означает, что агент связывается только с такой молекулой. Например, реагент, который специфически связывается с молекулой, может связываться с другими молекулами, обычно с намного меньшей аффинностью по данным, например, иммуноанализов, BIAcore®, инструмента KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или других анализов. В некоторых случаях, способность реагента в условиях специфического связывания связываться с молекулой-мишенью такова, что его аффинность или авидность составляет, 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 средней аффинности или авидности того же агента к сбору произвольных пептидов или полипептидов достаточного статистического размера.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, клетки-мишени (например, Т-клетки), имеют или экспрессируют молекулу на клеточной поверхности, например, маркер селектирования, так, что селектируемые клетки определяются присутствием, по меньшей мере, одной общей специфической молекулы (например, маркера селектирования). В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетку-мишень, также может содержать дополнительные клетки, которые лишены молекулы (например, маркера селектирования). Например, в некоторых вариантах осуществления, Т-клетки могут быть выбраны из образца, содержащего множество типов клеток, например, красных клеток крови или В-клеток. Маркер селектирования и рецепторная молекула могут применяться взаимозаменяемо в настоящем документе для обозначения молекулы клеточной поверхности.

В некоторых вариантах осуществления, рецепторная молекула, которая расположена на клеточной поверхности, например, поверхности клетки-мишени, может

быть любой молекулой, пока она остается ковалентно или не ковалентно связанной с клеточной поверхностью во время процесса хроматографического разделения в способе по настоящему изобретению. Рецепторной молекулой является молекула против которой может быть направлен рецептор-связывающий реагент. В некоторых вариантах осуществления, рецептором является пептид или белок, такой как белок рецептора мембраны. В некоторых вариантах осуществления, рецептором является жир, полисахарид или нуклеиновая кислота. Рецептор, который является белком, может быть периферическим мембранным белком или интегральным мембранным белком. В некоторых вариантах осуществления, он может иметь одни или более доменов, которые охватывают мембрану. В некоторых вариантах осуществления, рецепторной молекулой является поверхностный белок иммунной клетки, например, CD4, CD8 или CD57. В некоторых случаях, для Т-клетки рецепторной молекулой является CD3. В некоторых случаях, для Т-клетки рецепторной молекулой является CD4 или CD8. В некоторых вариантах осуществления, рецепторной молекулой может быть антиген, определяющий желаемую клеточную популяцию или субпопуляцию, например, популяцию или субпопуляцию клеток крови, например, лимфоцитов (например Т-клеток, CD57+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток).

В некоторых аспектах, молекулой клеточной поверхности, *например*, маркером селектирования, может быть антиген, определяющий желаемую клеточную популяцию или субпопуляцию, например, популяцию или субпопуляцию клеток крови, например, лимфоцитов (*например,* Т-клеток, Т-хелперных клеток, например, CD57- Т-клеток, CD3+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток, CD4+ Т-хелперных клеток, В клеток или естественных киллеров), моноцитов или стволовых клеток, *например,* CD34-положительных периферических стволовых клеток или Nanog или Oct-4 экспрессирующих стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления, маркером селектирования может быть маркер, экспрессированный на поверхности Т-клеток или подмножества Т-клеток, например, CD57, CD25, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA, и/или CD45RO. Примеры Т-клеток включают такие клетки, как CMV-специфические CD8+ Т-лимфоциты, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти и регуляторные Т-клетки (Treg). Иллюстративный пример Treg включает CD4 CD25 CD45RA Treg клетки, и иллюстративный пример Т-клеток памяти включает CD62L CD8+ специфические центральные Т-клетки памяти.

В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий реагент имеет или содержит сайт связывания В. В некоторых вариантах осуществления, сайт связывания В является одновалентным. В некоторых аспектах, одновалентный сайт связывания В является или содержит фрагмент одновалентного антитела или белковую связывающую молекулу с иммуноглобулин-подобными функциями, аптамер или MHC молекулу. Примеры фрагментов одновалентного антитела включают, но не ограничены ими, Fab фрагмент, Fv фрагмент и одноцепочечный Fv фрагмент (scFv), включая двухвалентный одноцепочечный Fv фрагмент. Примеры (рекомбинантных) фрагментов антитела

включают Fab фрагменты, Fv фрагменты, одноцепочечные Fv фрагменты (scFv), фрагмент двухвалентного 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 более сайтов связывания молекулы рецептор-связывающего реагента могут быть двухвалентными белковыми искусственными связывающими молекулами, такими как димерный мутеин липокалина, который также известен как «дуокалин». В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий реагент может иметь единственный второй сайт связывания, т.е., он может быть одновалентным. Примеры одновалентных рецептор-связывающих реагентов включают, но не ограничены ими, фрагмент одновалентного антитела, белковую связывающую молекулу с антитело-подобными связывающими свойствами или MHC молекулу.

Другими примерами подходящих белковых связывающих молекул являются EGF-подобный домен, Kringle-домен, домен фибронектина типа I, домен фибронектина типа II, домен фибронектина типа III, PAN домен, G1a домен, SRCR домен, домен ингибитора Kunitz/бычьего панкреатического трипсина, тендамистат, домен ингибитора серинпротеазы Kazal-типа, Trefoil (P-типа) домен, домен von Willebrand фактора типа C, анафилатоксин-подобный домен, CUB домен, повтор тироглобулина типа I, домен LDL-рецептора класса A, Sushi домен, Link домен, домен тромбоспондина типа I, домен иммуноглобулина или иммуноглобулин-подобный домен (например, антитела домена или антитела тяжелой цепи верблюда), домен C-типа лектина, MAM домен, домен von Willebrand фактора типа A, домен соматомедина B, домен WAP-типа четырехдисульфидного ядра, F5/8 типа C домен, домен Гемопексина, SH2 домен, SH3 домен, Ламинин-типа EGF-подобный домен, C2 домен, «Каппатела» (см. Ill. et al., Protein Eng (1997) 10, 949-57, так называемое «минитело» (Martin et al., EMBO J (1994) 13, 5303-5309), диатело (см. Holliger et al., PNAS USA (1993)90, 6444-6448), так называемый «Янус» (см. 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, кноттин, убиквитин, цинк-пальцевый белок, аутофлуоресцентный белок или белок насыщенного лейцином повтора. Примером молекулы нуклеиновой кислоты с антитело-подобными функциями является аптамер. Аптамер сворачивается в определенный трехмерный мотив и показывает высокую аффинность для данной целевой структуры.

В конкретных аспектах, рецептор-связывающий белок содержит партнер связывания C. В некоторых аспектах, партнер связывания C, включенный в рецептор-связывающий реагент, например, может быть на основе углеводорода (включая полимерный) и включает азотную, фосфорную, серную, карбеновую, галогеновую или псевогалогеновую группы. Он может быть спиртом, органической кислотой, неорганической кислотой, амином, фосфином, тиолом, дисульфидом, алканом, аминокислотой, пептидом, олигопептидом, полипептидом, белком, нуклеиновой

кислотой, жиром, сахаридом, олигосахаридом или полисахаридом. В качестве дополнительных примеров, он также может быть катионом, анионом, поликатионом, полианионом, поликатионом, электролитом, полиэлектролитом, углеродной нанотрубкой или углеродной нанопеной. Обычно такой партнер связывания имеет более высокую аффинность к сайту связывания реагента мультимеризации, чем к другому веществу. Примеры соответствующего партнера связывания включают, но не ограничены ими, краун эфир, иммуноглобулин, его фрагмент и белковую связывающую молекулу с антитело-подобными функциями.

В некоторых вариантах осуществления, партнер связывания С, который включен в рецептор-связывающий реагент, включает биотин, и аффинный реагент включает аналог стрептавидина или аналог авидина, который обратимо связывается с биотином. В некоторых вариантах осуществления, партнер связывания С, который включен в рецептор-связывающий реагент, включает аналог биотина, который обратимо связывается со стрептавидином или авидином, и аффинный реагент включает стрептавидин, авидин, аналог стрептавидина или аналог авидина, который обратимо связывается с соответствующим аналогом биотина. В некоторых вариантах осуществления партнер связывания С, который включен в рецептор-связывающий реагент, включает стрептавидин- или авидин-связывающий пептид, и аффинный реагент включает стрептавидин, авидин, аналог стрептавидина или аналог авидина, который обратимо связывается с соответствующим стрептавидин- или авидин-связывающим пептидом.

В некоторых вариантах осуществления, партнер связывания, который включен в рецептор-связывающий реагент, может включать стрептавидин-связывающий пептид В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность содержит последовательность с общей формулой His-Pro-Xaa, где Xaa является глутамином, аспарагином или метионином, такую, как содержится в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность имеет общую формулу, указанную в SEQ ID NO: 69, например, такую как указана в SEQ ID NO: 79. В одном примере, пептидной последовательностью является Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (также называемая Strep-tag®, указанная в SEQ ID NO: 75). В одном примере, пептидной последовательностью является Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (также называемая Strep-tag®, указанная в SEQ ID NO: 90). В одном примере, пептидной последовательностью является Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (также называемая Strep-tag® II, указанная в SEQ ID NO: 69), которая описана в патенте США № 6,103,493, например, и коммерчески доступна под торговым наименованием Strep-Tactin®. Стрептавидин-связывающие пептиды, например, могут одинарными пептидами, такими как «Strep-tag®», описанный в патенте США 5,506,121, например, или стрептавидин-связывающими пептидами, имеющими последовательное расположение двух или более отдельных связывающих молекул, как описано в публикации международного патента WO 02/077018 или патенте США 7,981,632.

В некотором варианте осуществления, партнер связывания С рецептор-

связывающего реагента включает группу, известную специалисту в данной области техники как аффинная метка. В таком варианте осуществления, аффинный реагент включает соответствующий партнер связывания, например, антитело или фрагмент антитела, известный как связывающийся с аффинной меткой. В качестве некоторых иллюстративных примеров известных аффинных меток, партнер связывания, который включен в рецептор-связывающий реагент, может включать динитрофенол или дигоксигенин, олигогистидин, полигистидин, иммуноглобулиновый домен, мальтоза-связывающий белок, глутатион-S-трансферазу (GST), хитин-связывающий белок (CBP) или тиоредоксин, кальмодулин-связывающий пептид (CBP), FLAG'-пептид, HA-метку, VSV-G-метку, HSV-метку, T7 эпитоп, мальтоза-связывающий белок (MBP), HSV эпитоп последовательности гликопротеина D вируса простого герпеса, «myc» эпитоп фактора транскрипции c-myc последовательности, V5-метку или глутатион-S-трансферазу (GST). В таком варианте осуществления комплекс, образованный между одним или более сайтами связывания аффинного реагента, в этом случае антитела или фрагмента антитела, и антигеном может быть разорван конкурентно добавлением свободного антигена, т.е. свободного пептида (эпитопной метки) или свободного белка (такого как MBP или CBP). Аффинная метка также может быть олигонуклеотидной меткой. Такая олигонуклеотидная метка, например, может применяться для гибридизации с олигонуклеотидом с комплементарной последовательностью, связанной с или включенной в аффинный реагент.

В соответствии с публикацией международной патентной заявки № WO 2013/011011 (полное содержание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки для всех целей) сила связывания между рецептор-связывающим реагентом и рецепторной молекулой на клетке-мишени может быть не существенной для обратимости связывания клетки-мишени с аффинным реагентом через рецептор-связывающий реагент. Скорее, независимо от силы связывания, означающей, что равновесная константа диссоциации (K_D) для связывания между рецептор-связывающим реагентом через сайт связывания B и рецепторной молекулы имеет низкую аффинность, например, в интервале K_D от примерно 10^{-3} до примерно 10^{-7} M или высокую аффинность, например, в интервале K_D от примерно 10^{-7} до примерно 1×10^{-10} M, клетка-мишень может быть обратимо окрашена, пока диссоциация связывания рецептор-связывающего реагента через сайт связывания B и рецепторной молекулы происходит достаточно быстро. В связи с этим, константа скорости диссоциации (k_{off}) связывания рецептор-связывающего реагента через сайт связывания B и рецепторной молекулы может иметь значение примерно 3×10^{-5} $сек^{-1}$ или больше (эта константа диссоциации является константой, характеризующей реакцию диссоциации комплекса, образованного между сайтом связывания B рецептор-связывающего реагента и рецепторной молекулой на поверхности клетки-мишени). Константа скорости ассоциации (k_{on}) для реакции ассоциации между сайтом связывания B рецептор-связывающего реагента и рецепторной молекулой на поверхности клетки-мишени может иметь любое значение. Чтобы обеспечить достаточно обратимое

связывание между рецепторной молекулой и рецептор-связывающим реагентом, предпочтительно выбирать значение k_{off} равновесия связывания, составляющее примерно 3 × 10-5 $сек^{-1}$ или больше, примерно 5 × 10^{-5} $сек^{-1}$ или больше, например или примерно 1 × 10^{-4} $сек^{-1}$ или больше, 5 × 10^{-4} $сек^{-1}$ или больше, 1 × 10^{-3} $сек^{-1}$ или больше, 5 × 10^{-3} $сек^{-1}$ или больше, а 1 × 10^{-2} $сек^{-1}$ или больше, 1 × 10^{-1} $сек^{-1}$ или больше или 5 × 10^{-1} $сек^{-1}$ или больше. В настоящем документе отмечено, что значения кинетической и термодинамической констант, применяемых в настоящем документе, относятся к условиям атмосферного давления, т.е. 1,013 бар, и комнатной температуры, т.е. 25°C.

В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий реагент имеет один (одновалентный) сайт связывания B, способный специфически связываться с рецепторной молекулой. В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий реагент имеет, по меньшей мере, два (т.е., множество сайтов связывания B, включая три, четыре, или даже пять идентичных сайтов связывания B), способных связываться с рецепторной молекулой. В любом из этих вариантов осуществления, связывание рецепторной молекулы через (каждый) сайт связывания B может иметь значение k_{off} примерно 3 × 10^{-5} $сек^{-1}$ или больше. Таким образом, рецептор-связывающий реагент может быть одновалентным (например, одновалентным фрагментом антитела или одновалентной искусственной связывающей молекулой (белковой или другой), таким как мутеин на основе полипептида семейства липокалина (также известный как «Anticalin®»), или двухвалентной молекулой, такой как антитело или фрагмент, в котором сохраняются оба сайта связывания, такой как F(ab')2 фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, рецепторной молекулой может быть мультивалентная молекула, такая как пентамерная IgE молекула, дающая значение k_{off} 3 × 10^{-5} $сек^{-1}$ или больше. В некоторых вариантах осуществления, Fab является анти-CD57 Fab. В конкретных вариантах осуществления, Fab является анти-CD4 Fab. В некоторых вариантах осуществления, Fab является анти-CD8 Fab.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, это на молекулярном уровне, а не k_{off} скорость (3 × 10^{-5} $сек^{-1}$ или больше) связывания рецептор-связывающего реагента через, по меньшей мере, сайт связывания B и рецепторную молекулу на клетки-мишени, обеспечивает (бесследное) выделение биологического материала с помощью технологии обратимой клеточной аффинной хроматографии, описанной здесь. Скорее, и как описано, например, в патенте США 7,776,562 или международной патентной заявке WO02/054065, низкая аффинность связывания между рецепторной молекулой и сайтом связывания B связывающего рецептор-связывающего реагента вместе с эффектом авидности, опосредованным через иммобилизованный аффинный реагент, позволяет обратимо и бесследно выделять клетку-мишень. В этих вариантах осуществления, может образовываться комплекс между двумя или более сайтами связывания Z аффинного реагента и партнера связывания C, по меньшей мере, двумя рецептор-связывающими реагентами, сто позволяет обратимую иммобилизацию и последующее элюирование клеток-мишеней из матрицы для аффинной хроматографии (через добавлением

конкурирующего агента, который будет разрывать связывание (комплекс), образованное между партнером связывания C и сайтом связывания Z, что, в свою очередь, приводит к диссоциации рецептор-связывающего реагента от клетки-мишени. Как указано выше, такая низкая аффинность связывания может быть охарактеризована константой диссоциации (K_D) в интервале от примерно $1,0 \times 10^{-3}$ M до примерно $1,0 \times 10^{-7}$ M для связывания рецептор-связывающего реагента через сайт связывания B и рецепторной молекулы на поверхности клетки-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, маркером селектирования может быть CD57, и рецептор-связывающий агент специфически связывает CD57. В некоторых аспектах, рецептор-связывающий агент, который специфически связывает CD3, может быть выбран из группы, состоящей из анти-CD57-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-CD57 антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-CD57 антитела и белковой CD57 связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. В некоторых вариантах осуществления, агент селектирования содержит анти-CD57 Fab фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления, маркером селектирования может быть CD4, и рецептор-связывающий агент специфически связывает CD4. В некоторых аспектах, рецептор-связывающий агент, который специфически связывает CD4, может быть выбран из группы, состоящей из анти-CD4-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-CD4 антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-CD4 антитела и белковой CD4 связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD4-антитело, такой как двухвалентный фрагмент антитела или одновалентный фрагмент антитела (*например,* CD4 Fab фрагмент) может быть получен из антитела 13B8.2 или функционально активного мутанта 13B8.2, который сохраняет специфическое связывание для CD4. Например, типовые мутанты антитела 13B8.2 или m13B8.2 описаны в патентах США №№ 7,482,000, заявке на патент США № US2014/0295458 или международной патентной заявке № WO2013/124474; и Bes, C, et al. J Biol Chem 278, 14265-14273 (2003). Мутантный Fab фрагмент, названный «ml3B8.2» несет вариабельный домен CD4 связывающего антитела мыши 13B8.2 и константный домен, содержащий константный CH1 домен человека типа гамма для тяжелой цепи, и константный домен легкой цепи человека типа каппа, как описано в патенте США 7,482,000. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD4 антитело, *например,* мутант антитела 13B8.2, содержит аминокислотную замену H91A в вариабельной легкой цепи, аминокислотную замену Y92A в вариабельной легкой цепи, аминокислотную замену H35A в вариабельной тяжелой цепи и/или аминокислотную замену R53A в вариабельной тяжелой цепи, каждая по нумерации Kabat. В некоторых аспектах, по сравнению с вариабельными доменами 13B8.2 Fab фрагмента в ml3B8.2, His остаток в положении 91 легкой цепи (положение 93 в SEQ ID NO: 96) мутирован до Ala, и Arg остаток в положении 53 тяжелой цепи (положение 55 a SEQ ID NO: 95) мутирован до Ala. В некоторых вариантах осуществления, реагент, который обратимо связан с анти-

CD4 или его фрагментом, коммерчески доступен или получен из реагента, который коммерчески доступен (*например,* каталожный № 6-8000-206 или 6-8000-205 или 6-8002-100; IBA GmbH, Gottingen, Germany). В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий агент содержит анти-CD4 Fab фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD4 Fab фрагмент содержит вариабельную тяжелую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:95, и вариабельную легкую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:96. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD4 Fab фрагмент содержит CDR вариабельной тяжелой цепи, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:95, и CDR вариабельной легкой цепи, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:96.

В некоторых вариантах осуществления, маркером селектирования может быть CD8, рецептор-связывающий агент специфически связывает CD8. В некоторых аспектах, рецептор-связывающий агент, который специфически связывает CD8, может быть выбирают из группы, состоящей из анти-CD8-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-CD8 антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-CD8 антитела и белковой CD8 связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD8-антитело, такое как двухвалентный фрагмент антитела или одновалентный фрагмент антитела (*например,* CD8 Fab фрагмент) может быть получен из антитела OKT8 (*например,* ATCC CRL-8014) или его функционально активного мутанта, который сохраняет специфическое связывание для CD8. В некоторых вариантах осуществления, реагент, который обратимо связан с анти-CD8 или его фрагментом является коммерчески доступным или получен из реагента, который является коммерчески доступным (*например,* каталожный № 6-8003 или 6-8000-201; IBA GmbH, Gottingen, Germany). В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий агент содержит фрагмент анти-CD8 Fab. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент анти-CD8 Fab содержит вариабельную тяжелую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:97, и вариабельную легкую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:98. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент анти-CD8 Fab содержит CDR вариабельной тяжелой цепи, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:97, и CDR вариабельной легкой цепи, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:98.

В некоторых вариантах осуществления, маркером селектирования может быть CD3 и рецептор-связывающий агент специфически связывает CD3. В некоторых аспектах, рецептор-связывающий агент, который специфически связывает CD3, может быть выбран из группы, состоящей из анти-CD3-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-CD3 антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-CD3 антитела и белковой CD3 связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD3-антитело, такое как двухвалентный фрагмент антитела или одновалентный фрагмент антитела (*например,* CD3 Fab фрагмент) может быть получен из антитела OKT3 (*например,* ATCC CRL-8001; см., *например*, Stemberger et

al. PLoS One. 2012; 7(4): e35798) или его функционально активного мутанта, который сохраняет специфическое связывание для CD3. В некоторых вариантах осуществления, реагент, который обратимо связан с анти-CD3 или его фрагментом является коммерчески доступным или получен из реагента, который является коммерчески доступным (*например* каталожный № 6-8000-201, 6-8001-100; IBA GmbH, Gottingen, Germany). В некоторых вариантах осуществления, рецептор-связывающий агент содержит анти-CD3 Fab фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD3 Fab фрагмент содержит вариабельную тяжелую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:93, и вариабельную легкую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO:94. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD3 Fab фрагмент содержит CDR вариабельной тяжелой цепи, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:93, и CDR вариабельной легкой цепи, имеющей последовательность, указанную в SEQ ID NO:94.

В любом из указанных выше примеров, двухвалентным фрагментом антитела может быть (Fab)2'-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv фрагмент, а одновалентный фрагмент антитела может быть выбран из группы, состоящей из Fab фрагмента, Fv фрагмента и одноцепочечного Fv фрагмента (scFv). В любом из указанных выше примеров, белковой связывающей молекулой с антитело-подобными связывающими свойствами может быть аптамер, мутеин на основе полипептида семейства липокалина, аналог антитела на основе глутатион-S-трансферазы, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллического каркаса, аднектин и авимер.

В некоторых вариантах осуществления, выделение и/или селектирование хроматографическим выделением дает одну или более популяций обогащенных Т-клеток, которые включают, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% CD57- CD3+ Т-клеток. В конкретном варианте осуществления, популяция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD57- CD3+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, выделение и/или обогащение хроматографическим выделеним дает популяции обогащенных CD4+ Т-клеток, которые включают, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% CD57- CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, входная композиция CD4+ Т-клеток включает менее чем 40%, менее чем 35%, 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% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяция

обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD57- CD4+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, выделение и/или обогащение хроматографическим выделением дает популяции обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток, которые включают, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% CD57- CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция CD8+ Т-клеток содержит менее чем 40%, менее чем 35%, 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% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD57- CD8+ Т-клеток.

D. Входные композиции

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы применяют в связи с получением или приготовлением входной популяции или композиции клеток (входная композиция или входная популяция применяются в настоящем документе взаимозаменяемо). В некоторых вариантах осуществления, входная композиция является клетками, созданными согласно любому из представленных способов, как описано, например ниже, для селектирования Т-клеток из биологического образца (например, образца, содержащего первичные Т-клетки, такого как образец лейкафереза или афереза). В некоторых вариантах осуществления, входная клеточная композиция включает популяцию клеток для применения в генетическом конструировании, например, клеток, которые генетически сконструированы или которые были подвергнуты процессу получения генетически сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки обрабатывают с, подвергают контакту с или инкубируют с нуклеиновой кислотой, которая кодирует рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, входная композиция содержит Т-клетки, жизнеспособные Т-клетки, CD57- Т-клетки, CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки и/или их субпопуляции.

В некоторых вариантах осуществления, жизнеспособность клетки оценивают анализом, который может включать, но не ограничен ими, анализы с поступлением красителя (например, анализы кальцеина АМ), XTT анализы жизнеспособности клеток и анализы с освобождением красителя (например, анализы с освобождением красителя триптанового синего, Эозина или пропидия). В конкретных вариантах осуществления, жизнеспособные клетки имеют отрицательную экспрессию одного или более апоптотических маркеров, например, Аннексина V или активной Каспазы 3. В некоторых вариантах осуществления, жизнеспособные клетки являются отрицательными для экспрессии одного или более маркеров апоптоза, которые могут включать, но не ограничены ими, каспазу или активную каспазу, например, каспазу 2, каспазу 3, каспазу 6,

каспазу 7, каспазу 8, каспазу 9 или каспазу 10, члены семейства Bcl-2, например, Bax, Bad и Bid, Аннексин V или TUNEL окрашивание. В конкретных вариантах осуществления, жизнеспособные клетки являются отрицательными для активной каспазы 3. В некоторых вариантах осуществления, жизнеспособные клетки являются отрицательными для Аннексина V.

В некоторых вариантах осуществления, входная композиция содержит популяцию обогащенных CD57-Т-клеток, например, жизнеспособных CD57- Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% клеток входной популяции являются CD57- Т-клетками, например, жизнеспособными CD57- Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, входная популяция состоит по существу из CD57- Т-клеток, например, жизнеспособных CD57- Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, входной популяцией является популяция клеток, обогащенная CD4+ Т-клетками и CD8+ Т-клетками, например, CD4+ Т-клетками и CD8+ Т-клетками. В конкретных вариантах осуществления, входная популяция является или включает, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% клеток, которыми являются CD3+Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, входная популяция является или включает, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% клеток, которыми являются CD4+ и CD8+Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, входная популяция состоит по существу из CD4+ и CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, входная популяция является или включает, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% клеток CD3+ Т-клеток (CD4+ и CD8+Т-клеток), которыми являются CD57-, например, жизнеспособные CD57- Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, входной популяцией является популяция обогащенных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% клеток входной популяции являются CD4+ Т-

клетки. В некоторых вариантах осуществления, входная популяция состоит по существу из CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, входная популяция является или включает, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% клеток CD4+Т-клеток, которыми являются CD57-, например жизнеспособные CD57- Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, входной популяцией является популяция обогащенных CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% клеток входной популяции являются CD8+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, входная популяция состоит по существу из CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, входная популяция является или включает, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% клеток CD8+Т-клеток, которые являются CD57-, например жизнеспособными CD57- Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления, клетки из популяции обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток и клетки из популяции обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток смешивают, комбинируют и/или объединяют для создания входной популяции, содержащей CD57-CD4+ Т-клетки и CD57-CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяции обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток и CD57-CD8+ Т-клеток объединяют, смешивают и/или комбинируют до стимулирования клеток, например, культивирования клеток в условиях стимулирования. В конкретных вариантах осуществления, популяции обогащенных CD57-CD4+ и CD57-CD8+ Т-клеток объединяют, смешивают и/или комбинируют после замораживания, например, криоконсервирования, и размораживания популяций, обогащенных CD57-CD4+ и CD57-CD8+ Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления, входную популяцию получают, создают или делают смешиванием, объединением и/или комбинированием клеток из популяции обогащенных CD57-CD4+ клеток с клетками из популяции обогащенных CD57-CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток содержит, по меньшей мере, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% CD57-CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток содержит 100% CD57-CD4+ Т-клеток или содержит примерно 100% CD57-CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных Т-клеток включает или содержит менее чем 20%, менее чем 10%, менее чем 5%, менее чем 1%, менее чем 0,1% или менее чем 0,01% CD57-CD8+ Т-клеток, и/или не

содержит CD57-CD8+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD57-CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток состоят по существу из CD57-CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток содержит, по меньшей мере, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% CD57-CD8+ Т-клеток или содержит или содержит примерно 100% CD57-CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток включает или содержит менее чем 20%, менее чем 10%, менее чем 5%, менее чем 1%, менее чем 0,1% или менее чем 0,01% CD57-CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD57-CD4+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD57-CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток состоят по существу из CD57-CD8+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки объединяют, смешивают и/или комбинируют при отношении от 1:10 до 10:1, от 1:5 до 5:1, от 4:1 до 1:4, от 1:3 до 3:1, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,25:1 до 1:1,25, от 1,2:1 до 1:1,2, от 1,1:1 до 1:1,1, или примерно 1:1 или 1:1 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления, жизнеспособные CD4+ Т-клетки и жизнеспособные CD8+ Т-клетки объединяют, смешивают и/или комбинируют при отношении от 1:10 до 10:1, от 1:5 до 5:1, от 4:1 до 1:4, от 1:3 до 3:1, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,25:1 до 1:1,25, от 1,2:1 до 1:1,2, от 1,1:1 до 1:1,1, или примерно 1:1 или 1:1 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам.

В конкретных вариантах осуществления, входная композиция имеет количество равное, равное примерно или равное, 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, $1{,}000 \times 10^6$, $1{,}100 \times 10^6$ или $1{,}200 \times 10^6$Т-клеток, таких как жизнеспособные Т-клетки, жизнеспособные CD3+ Т-клетки или жизнеспособные смешанные CD4+ и CD8+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, входная композиция имеет количество равное, равное примерное или равное, 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, 600×10^6CD4+ Т-клеток, например, жизнеспособных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, входная композиция имеет количество равное, равное примерное или равное, 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, 600×10^6CD8+ Т-клеток, например, жизнеспособных CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, количеством клеток является количество жизнеспособных CD4+ и CD8+ Т-клеток, объединенных, смешанных и/или комбинированных вместе в одной и той же композиции. В таких вариантах осуществления, CD4+ и CD8+ Т-клетки присутствуют в отношении от 1:3 до 3:1, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,25:1 до 1:1,25, от 1,2:1 до 1:1,2, от 1,1:1 до 1:1,1, или примерно 1:1 или 1:1 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления, количеством клеток является количество жизнеспособных CD4+ и CD8+ Т-клеток объединенных, смешанных и/или

комбинированных вместе при отношении примерно 1:1 или 1:1 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам.

В конкретных вариантах осуществления, входная композиция имеет количество равное от или от примерно 300 × 10^6 и 600 × 10^6 Т-клеток, например, жизнеспособных CD3+ клеток или смешанных жизнеспособных CD4+ и жизнеспособных CD8+ клеток (например, смешанных точно или примерно в соотношении 1:1). В некоторых вариантах осуществления, входная популяция имеет количество, равное или равное примерно 300 × 10^6, например, жизнеспособных CD3+ клеток или смешанных жизнеспособных CD4+ и жизнеспособных CD8+ клеток (например, смешанных точно или примерно в соотношении 1:1). В некоторых вариантах осуществления, входная популяция имеет количество, равное или равное примерно 400 × 10^6, например, жизнеспособных CD3+ клеток или смешанных жизнеспособных CD4+ и жизнеспособных CD8+ клеток (например, смешанных точно или примерно в соотношении 1:1). В некоторых вариантах осуществления, входная популяция имеет количество, равное или равное примерно 500 × 10^6, например, жизнеспособных CD3+ клеток или смешанных жизнеспособных CD4+ и жизнеспособных CD8+ клеток (например, смешанных точно или примерно в соотношении 1:1). В некоторых вариантах осуществления, входная популяция имеет количество, равное или равное примерно 600 × 10^6, например, жизнеспособных CD3+ клеток или смешанных жизнеспособных CD4+ и жизнеспособных CD8+ клеток (например, смешанных точно или примерно в соотношении 1:1). В некоторых вариантах осуществления, входная популяция имеет количество, равное или равное примерно 700 × 10^6, например, жизнеспособных CD3+ клеток или смешанных жизнеспособных CD4+ и жизнеспособных CD8+ клеток (например, смешанных точно или примерно в соотношении 1:1). В некоторых вариантах осуществления, входная популяция имеет количество, равное или равное примерно 800 × 10^6, например, жизнеспособных CD3+ клеток или смешанных жизнеспособных CD4+ и жизнеспособных CD8+ клеток (например, смешанных точно или примерно в соотношении 1:1). В некоторых вариантах осуществления, входная популяция имеет количество, равное или равное примерно 900 × 10^6, например, жизнеспособных CD3+ клеток или смешанных жизнеспособных CD4+ и жизнеспособных CD8+ клеток (например, смешанных точно или примерно в соотношении 1:1). В некоторых вариантах осуществления, входная популяция имеет количество, равное или равное примерно 100 × 10^7, например, жизнеспособных CD3+ клеток или смешанных жизнеспособных CD4+ и жизнеспособных CD8+ клеток (например, смешанных точно или примерно в соотношении 1:1). В некоторых вариантах осуществления, входная популяция имеет количество, равное или равное примерно 110 × 10^7, например, жизнеспособных CD3+ клеток или смешанных жизнеспособных CD4+ и жизнеспособных CD8+ клеток (например, смешанных точно или примерно в соотношении 1:1). В некоторых вариантах осуществления, входная популяция имеет количество, равное или равное примерно 120 × 10^7, например, жизнеспособных CD3+ клеток или смешанных жизнеспособных CD4+ и жизнеспособных CD8+ клеток (например, смешанных точно или примерно в соотношении 1:1).

В некоторых вариантах осуществления, CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки объединяют, смешивают и/или комбинируют так, что входная композиция имеет вплоть до или вплоть до примерно целевого количества (2n) Т-клеток, таких как жизнеспособные Т-клетки, жизнеспособные CD3+ Т-клетки или жизнеспособные смешанные CD4+ и CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, если композиция, содержащая обогащенные CD4+ Т-клетки, содержит, по меньшей мере, n CD4+ Т-клеток, и композиции, содержащая обогащенные CD8+ Т-клетки (например, полученные от того же донора, например, из того же образца афереза или лейкафереза от донора, что и CD4+ композиция Т-клеток) содержит, по меньшей мере, n CD8+ Т-клеток, n CD4+ Т-клеток из CD4+ композиции Т-клеток и n CD8+ Т-клеток из CD8+ композиции Т-клеток объединяют, смешивают и/или комбинируют (т.е. в 1:1 соотношении CD4+ к CD8+) для создания входной композиции, содержащей целевое количество (2n) Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, где композиция, содержащая обогащенные CD4+ Т-клетки содержит не более чем (например, менее чем) n CD4+ Т-клеток, и композиция, содержащая обогащенные CD8+ Т-клетки (например, полученные от того же донора, например, из того же образца афереза или лейкафереза от донора, что и CD4+ композиция Т-клеток) содержит не более чем (например, менее чем) n CD8+ Т-клеток, все клетки CD4+ композиции Т-клеток и все клетки CD8+ композиции Т-клеток объединяют, смешивают и/или комбинируют для создания входной композиции. В этих вариантах осуществления, входная композиция может содержать меньше целевого количества (2n) Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, если композиция, содержащая обогащенные CD4+ Т-клетки, содержит меньше чем n CD4+ Т-клеток, и композиция, содержащая обогащенные CD8+ Т-клетки (например, полученные от того же донора, например, из того же образца афереза или лейкафереза от донора, что и CD4+ композиция Т-клеток) содержит больше чем n CD8+ Т-клеток или наоборот, клетки CD4+ или CD8+ композиции Т-клеток применяют добавления альтернативного типа клеток так, что входная композиция содержит вплоть до целевого количества (2n) Т-клеток. В любом из предшествующих вариантов осуществления, целевое количество 2n может составлять 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, $1{,}000 \times 10^6$, $1{,}100 \times 10^6$ или $1{,}200 \times 10^6$.

В некоторых вариантах осуществления, 450 × 106 CD4+ Т-клеток из композиции, содержащей обогащенные CD4+ Т-клетки, и 450×10^6 CD8+ Т-клеток из композиции, содержащей обогащенные CD8+ Т-клетки (например, полученные от того же донора, например, из того же образца афереза или лейкафереза от донора, что и CD4+ композиция Т-клеток) объединяют, смешивают и/или комбинируют с получением входной композиции, содержащей 900×10^6 CD4+ и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, если композиция, содержащая обогащенные CD4+ Т-клетки, содержит менее чем 450×10^6 CD4+ Т-клеток, и композиция, содержащая обогащенные CD8+ Т-клетки (например, полученные от того же донора, например, из того же образца афереза или лейкафереза от донора, что и CD4+ композиция Т-клеток) содержит менее чем 450 ×

10^6 CD8+ Т-клеток, все клетки CD4+ композиции Т-клеток и все клетки CD8+ композиции Т-клеток объединяют, смешивают и/или комбинируют с получением входной композиции. В некоторых вариантах осуществления, если любая из композиции содержит менее чем 450 × 10^6 CD4+ или CD8+ клеток, а другая композиция содержит более чем 450 × 10^6 CD8+ клеток или CD4+ клеток, тогда вплоть до 900 × 10^6 CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток объединяют для создания входной композиции. Общее количество CD4+ и CD8+ Т-клеток во входной композиции может быть ниже, чем 900 × 10^6. Другими словами, клетки композиции, содержащей обогащенные CD4+ Т-клетки, могут быть использованы для добавления к композиции, содержащей обогащенные CD8+ Т-клетки или наоборот, для получения входной композиции, содержащей вплоть до целевого количества (2n) Т-клеток, например, вплоть до 900 × 10^6 Т-клеток, подвергаемых стимулированию.

Хотя в вышеуказанных вариантах осуществления процессы селектирования, выделения, разделения, обогащения и/или очистки клеток обсуждаются в контексте получения входной композиции, должно быть понятно, что процессы селектирования, выделения, разделения, обогащения и/или очистки клеток, описанные в настоящем документе, могут применяться во время, до или между любыми из последующих стадий (например, активации, стимулирования, конструирования, трансдукции, трансфекции, инкубирования, культивирования, сбора, составления и/или введения составленной клеточной популяции субъекту), в любой подходящей комбинации и/или порядке. Например, стадия селектирования, выделения, разделения, обогащения и/или очистки Т-клеток может проводиться между активацией/стимулированием Т-клеток и трансдукцией Т-клеток. В другом примере, стадия селектирования, выделения, разделения, обогащения и/или очистки Т-клеток может проводиться после трансдукции Т-клеток, но до сбора, до получения и/или до составления клеток. В конкретном примере, стадия селектирования, выделения, разделения, обогащения и/или очистки Т-клеток может проводиться непосредственно перед сбором клеток в качестве стадии очистки или осветления. В некоторых вариантах осуществления, стадию селектирования Т-клеток хроматографией проводят между активацией/стимулированием Т-клеток и трансдукцией Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, стадию селектирования Т-клеток хроматографией проводят после трансдукции Т-клеток, но до сбора, до получения и/или до составления клеток. В некоторых вариантах осуществления, стадию селектирования Т-клеток хроматографией проводят непосредственно перед сбором клеток.

В некоторых вариантах осуществления, входную композицию подвергают одной или более стадиям разведения и/или промывания, например, бессывороточной средой, до стимулирования клеток, например, культивирования клеток в условиях стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, стадия разведения и/или промывания позволяет заменить среду на бессывороточную среду, такую, как описана в PCT/US2018/064627, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит минимальную среду (например, OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Media (ThermoFisher)),

с добавлением одной или более добавок. В некоторых вариантах осуществления, одна или более добавок не содержат сыворотку. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит минимальную среду с добавлением одного или более дополнительных компонентов для сохранения, размножения и/или активации клеток (например, Т-клеток), таких, как предоставляются дополнительной добавкой (например OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (ThermoFisher)). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит добавку для замены сыворотки, например, замену сыворотки для иммунных клеток, например, ThermoFisher, #A2596101, CTS™ Immune Cell Serum Replacement, или замену сыворотки для иммунных клеток, описанную у 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 более рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный IL-2 человека, рекомбинантный IL-7 человека и/или рекомбинантный IL-15 человека.

В некоторых вариантах осуществления, входную композицию создают смешиванием, комбинированием и/или объединением популяции, обогащенной CD57-CD8+ Т-клетками, созданным из исходного образца, такого как PBMC или образец лейкафереза, с популяцией, обогащенной CD57-CD4+ Т-клетками, созданными из исходного образца. В некоторых вариантах осуществления, популяцию, обогащенную CD57-CD4+ Т-клетками, создают из CD8-отрицательной фракции, созданной во время процесса создания популяции, обогащенной CD8+ Т-клетками из исходного образца. В конкретных вариантах осуществления, входная композиция имеет отношение примерно 1:1 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам, и ее подвергают одной или более стадиям промывания, например, бессывороточной средой, описанной в PCT/US2018/064627, до стимулирования клеток, например, культивирования клеток в условиях стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, одна или более стадий промывания позволяет заменить среду с PBS/EDTA буфера, содержащего альбумин, на бессывороточную среду, которую также применяют при стимулировании клеток.

III. СПОСОБ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНСТРУИРОВАНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ОБОГАЩЕННЫХ CD57- КЛЕТОК

Представленные способы включают способы генетического конструирования Т-клеток с рекомбинантным рецептором, таким как химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых аспектах, представленные способы могут включать одну или более стадий стимулирования, активирования, конструирования, культивирования и/или размножения одной или более популяций обогащенных CD57- Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, одна или более популяций являются или включают любые популяции CD57- Т-клеток, описанных в настоящем документе, например, в разделе I. В некоторых

вариантах осуществления, одну или более популяций выделяют, селектируют или обогащают из биологического образца любым способом или процессом, описанным в настоящем документе, например, в разделе II. В некоторых вариантах осуществления, одну или более популяций обогащенных CD57- Т-клеток стимулируют или активируют, например, инкубированием клеточной популяции в условиях стимулирования, например, любых условиях стимулирования, описанных в настоящем документе, например, в разделе III.A. В некоторых вариантах осуществления, одну или более популяций обогащенных CD57- Т-клеток генетически конструируют, например, введением гетерологичного полинуклеотида в клетки одной или более популяций. В некоторых вариантах осуществления, введение проводят любым способом генетического конструирования, представленным в настоящем документе, например, в разделе III.B. В некоторых аспектах, представленные способы могут включать инкубирование трансдуцированных Т-клеток в условиях, позволяющих интеграцию вирусного вектора в геном клетки.

Представленные способы могут включать способы, в которых сконструированные клетки больше не культивируют для целей размножения популяции клеток. Например, в некоторых аспектах, собранные клетки не подвергают какому-либо инкубированию или культивированию, где количество общих жизнеспособных клеток повышается в конце инкубирования или культивирования по сравнению с количеством общих жизнеспособных клеток в начале инкубирования или культивирования. В некоторых вариантах осуществления, собранные клетки не подвергают какому-либо инкубированию или культивированию непосредственно для целей повышения (например, размножения) общего количества жизнеспособных клеток в конце процесса инкубирования или культивирования по сравнению с началом указанного процесса инкубирования или культивирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют или культивируют в условиях, которые могут вызвать размножение, но условия инкубирования или культивирования не создают с целью размножения клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, собранные клетки могут размножаться несмотря на производство с применением процесса, который не включает стадию размножения. В некоторых вариантах осуществления, производственный процесс, который не включает стадию размножения, называют процессом с отсутствующим или минимальным размножением. Процесс «с отсутствующим размножением» также может быть назван процессом «с минимальным размножением». В некоторых вариантах осуществления, процессом с отсутствующим или минимальным размножением может дать клетки, размножившиеся несмотря на то, что процесс не включает стадию размножения. В некоторых вариантах осуществления, собранные клетки могут быть подвергнуты стадии инкубирования или культивирования, которая включает среду с композицией, созданной для снижения, подавления, минимизации или исключения размножения клеточной популяции в целом. В некоторых вариантах осуществления, полученные, собранные или составленные клетки не ранее не подвергались

инкубированию или культивированию, которое проводят в биореакторе или в условиях, в которых клетки взбалтывают, вращают, встряхивают или перфузируют в течение всего или части инкубирования или культивирования.

В некоторых вариантах осуществления, одну или более популяций обогащенных CD57- Т-клеток культивируют, например, культивируют в условиях, которые способствуют или позволяют деление, рост или размножение Т-клеток, в течение фиксированного количества времени или до достижения порогового предела для размножения. В некоторых аспектах, культивирование проводят любым способом, описанным в настоящем документе, например, в разделе III.C.

В конкретных вариантах осуществления, в настоящем документе представлены способы создания генетически сконструированной композиции Т-клеток из одной или более исходных, например, входных, популяций CD57- Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяцию обогащенных CD57- Т-клеток инкубируют в условиях стимулирования, тем самым создавая стимулированную популяцию. В некоторых вариантах осуществления, стимулирование, например, культивирование клеток в условиях стимулирования, проводят в течение установленного или фиксированного количества времени, например, количества времени менее 2 дней, или в течение количества времени от 18 часов до 30 часов. В некоторых аспектах, стимулирование стимулирующим реагентом проводят в течение точно или примерно 20 часов ± 4 часа.

В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный полинуклеотид вводят в клетки стимулированной популяции, тем самым создавая трансформированную популяцию. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют либо во врем, либо после генетического конструирования клеток, например, в течение времени, достаточного для интеграции гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок, или чтобы позволить экспрессию рекомбинантного белка. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в течение установленного или фиксированного количества времени, например, количества времени более 18 часов или менее чем 4 дней, например, 72 часов ± 6 часов. В любом из представленных вариантов осуществления, введение может проводиться на клетках после того, как они были стимулированы стимулирующим реагентом. В некоторых вариантах осуществления, стадию конструирования начинают или инициируют в течение установленного количества времени от начала или инициации стимулирования, например, в течение 30 часов от добавления, культивирования или контакта стимулирующего реагента с клетками. В конкретных вариантах осуществления, стадию конструирования начинают или инициируют в пределах от 18 часов до 30 часов, например, 20 часов ± 4 часа, после добавления, культивирования или контакта стимулирующего реагента с клетками.

В некоторых вариантах осуществления, трансформированную популяцию затем размножают, например, в течение установленного количества времени или до достижения порога размножения, тем самым получая размноженную популяцию. В конкретных

вариантах осуществления, трансформированную популяцию или размноженную популяцию собирают или получают и необязательно составляют, например, для введения субъекту или для криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления, популяция является или содержит CD57- CD4+ Т-клетки и CD57- CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяция является или содержит CD57- CD3+ Т-клетки.

В конкретных вариантах осуществления, популяции обогащенных Т-клеток могут быть получены, составлены для криозащиты, замораживания (например, криозащиты) и/или хранения ниже 0°C, ниже -20°C или при или ниже -70C или -80°C до, во время или после любого хранения или стадии процесса создания сконструированных популяций обогащенных Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы. В некоторых вариантах осуществления, клетки могут храниться в течение количества времени менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней или в течение количества времени менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 недели или в течение количества времени, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недели или в течение более 8 недель. После хранения, популяции обогащенных Т-клеток могут быть размороженны, и обработка может быть возобновлена с того же момента процесса. В некоторых вариантах осуществления, входные популяции обогащенных Т-клеток криозащищают хранят до дальнейшей обработки, например, инкубирования в условиях стимулирования. В конкретных вариантах осуществления, культивированные и/или составленные популяции обогащенных Т-клеток криозащищают и хранят до введения субъекту, например, в виде аутологичной клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем документе, применяют в связи со способом, где сконструированные клетки создают способом, который включает стадии стимулирования клеток с последующим введением полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, например, CAR, в клетки. В конкретных вариантах осуществления, стимулирование проводят в течение от 18 до 30 часов, например в течение примерно 24 часов, и затем проводят введение полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают, например, составляют для криоконсервации субъекту, в пределах 3 дней после начала введения полинуклеотида. В разных вариантах осуществления, клетки собирают или получают, например, составляют для криоконсервации или введения субъекту, в пределах 4 дней после начала инкубирования в условиях стимулирования.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлены способы создания генетически сконструированной композиции Т-клеток из двух начальных, например, входных популяций CD57- Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, две популяции обогащенных CD57- Т-клеток по отдельности инкубируют в условиях стимулирования, тем самым создавая две разные стимулированные популяции. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный полинуклеотид вводят в клетки двух отдельных стимулированных популяций, тем самым создавая две разные трансформированные популяции. В некоторых вариантах осуществления, две разные

трансформированные популяции затем размножают, например, в течение установленного количества времени или до достижения порога размножения, тем самым получая две разные размноженные популяции. В конкретных вариантах осуществления, две разные трансформированные популяции или две разные размноженные популяции собирают или получают и, необязательно, составляют, например, для введения субъекту или для криоконсервации. В конкретных вариантах осуществления, две отдельные популяции происходят или получают из одного и того же биологического образца или разных биологических образцов от одного и того же индивидуального субъекта. В некоторых вариантах осуществления, две отдельные популяции являются или содержат популяцию обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток и отдельную популяцию CD57- CD8+ Т-клеток.

Также представлены способы идентификации популяции клеток, способных к размножению или пролиферации, например, во время инкубирования или культивирования в условиях, которые способствуют пролиферации или размножению Т-клеток, таких как любые такие условия, описанные в настоящем документе, например, разделе III.C. В некоторых вариантах осуществления, такие способы являются или включают измерение частоты CD57+ клеток в популяции, где если частота CD57+ клеток ниже пороговой частоты, популяция способна к размножению. В некоторых вариантах осуществления, пороговая частота составляет менее чем 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1%. В некоторых вариантах осуществления, порог составляет или составляет примерно 20%. В некоторых вариантах осуществления, популяция, которая способна к размножению, размножается, по меньшей мере, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно или 5-кратно в течение 10, 11, 12, 13 или 14 дней во время культивирования в условиях, которые способствуют пролиферации или размножению. В некоторых вариантах осуществления, популяция, которая способна к размножению, размножается, по меньшей мере, 4-кратно в пределах 11 дней во время культивирования, например, культивирования, представленного в настоящем документе, например, в разделе III.C.

В некоторых вариантах осуществления, способ является или включает измерение значения признака, ассоциированного с CD57 экспрессией популяции Т-клеток, где популяция Т-клеток способна к размножению клеточной терапии, если значение признака составляет менее порогового значения признака. В некоторых вариантах осуществления, признаком является уровень или количество полипептида, кодированного CD57, присутствующим в общих Т-клетках, CD4+ Т-клетках или CD8+ Т-клетках дозы. В некоторых вариантах осуществления, признаком является уровень или количество полипептида, кодированного CD57, присутствующим на поверхности общих Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток дозы, в конкретных вариантах осуществления, признаком является частота, доля или количество присутствующих Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток, положительных для экспрессии CD57. В некоторых вариантах осуществления, признаком является уровень или количество иРНК второго гена, присутствующего в Т-клетке. В конкретных вариантах осуществления, уровень или количество доступности CD57.

В некоторых вариантах осуществления, пороговое значение на, на примерно или в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% ниже среднего или медианного измерения признака, ассоциированного с CD57 экспрессией, и/или на менее одно стандартное отклонение ниже, чем среднее или медианное измерение, во множестве эталонных Т-клеточных популяций. В некоторых вариантах осуществления, пороговое значение ниже наименьшего измерения признака, ассоциированного с CD57 экспрессией, необязательно в пределах 50%, в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% ниже наименьшего измерения, в популяции из множества эталонных Т-клеточных популяций. В некоторых вариантах осуществления, порог составляет ниже среднего или медианного измерения признака, ассоциированного с CD57 экспрессией, рассчитанного из более чем 65%, 75%, 80%, 85% образцов из множества эталонных композиций Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, множеством эталонных Т-клеточных популяций является множество популяций, которые не размножаются при культивировании в условиях, которые способствуют пролиферации или размножению Т-клеток, необязательно, где клетки не размножаются, по меньшей мере, 3-кратно, 4-кратно или 5-кратно, в пределах 10, 11, 12, 13 или 14 дней культивирования, например, культивирования, описанного в настоящем документе, например, в разделе III.C. В некоторых вариантах осуществления, эталонные Т-клеточные популяции не размножаются, по меньшей мере, 4-кратно в пределах 11 дней культивирования.

В некоторых вариантах осуществления, сбор проводят во время или после момента, в который сконструированная популяция или размноженная популяция Т-клеток достигает порогового количества Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток, или пороговой концентрации Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, пороговое количество или концентрация Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток достигается в пределах точно или примерно 4, 5, 6 или 7 дней после начала стимулирования.

В некоторых вариантах осуществления, для множества популяций сконструированных Т-клеток или популяций размноженных Т-клеток, пороговое количество или концентрация Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток достигается в пределах точно или примерно 5 или 6 дней после инициации стимулирования в, по меньшей мере, точно или примерно или, по меньшей мере, точно или примерно 70%, 80%, 90% или 95% множества. В некоторых вариантах осуществления, пороговое количество или концентрация Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток достигается в пределах точно или примерно 2, 3, 4 или 5 дупликаций популяций после инициации стимулирования.

В некоторых вариантах осуществления, способ также включает измерение значения признака, ассоциированного с экспрессией второго гена, так, что популяция способна к размножению, если значение признака, ассоциированного с CD57 экспрессией, меньше порогового значения, и если признак, ассоциированный с экспрессией второго гена больше второго порога. В некоторых вариантах осуществления, вторым геном является маркер подобных наивным клеток, такой как, но не ограниченный ими, CD25, CD27, CD28, CCR7 или CD45RA. В некоторых вариантах осуществления, второй ген кодирует CD27.

A. Стимулирование

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы применяют в связи с инкубированием клеток, например, CD57- Т-клеток, в условиях стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, условия стимулирования включают условия, которые активируют или стимулируют, и/или способны активировать или стимулировать сигнал в клетке, например, CD4+ или CD8+ Т-клетке, такой как сигнал, созданный из TCR и/или корецептора. В некоторых вариантах осуществления, условия стимулирования включают одну или более стадий культивирования, культивирования, инкубирования, активирования, размножения клеток с и/или в присутствии стимулирующего реагента, например, реагента, который активирует или стимулирует, и/или способен активировать или стимулировать сигнал в клетке. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент стимулирует и/или активирует TCR и/или корецептор. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующим реагентом является реагент, описанный в разделе III.A.1.

В некоторых вариантах осуществления, одну или более популяций обогащенных CD57- Т-клеток инкубируют в условиях стимулирования до генетического конструирования клеток, например, трансфицирования и/или трансдуцирования клеток, например, методом, представленным в разделе III.B. В конкретных вариантах осуществления, одну или более популяций обогащенных CD57- Т-клеток инкубируют в условиях стимулирования после выделения, селектирования, обогащения или получения одной или более композиций из биологического образца. В конкретных вариантах осуществления, одну или более популяций обогащенных CD57- Т-клеток предварительно криоконсервируют и хранят и размораживают до инкубирования.

В некоторых вариантах осуществления, одна или более популяций обогащенных CD57- Т-клеток является или включает две отдельных популяции обогащенных CD57- Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, две отдельных композиции обогащенных Т-клеток, например, две отдельных композиции обогащенных Т-клеток, выбранных, выделенных и/или обогащенных из одного и того же биологического образца, отдельно инкубируют в условиях стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, две отдельных композиции включают композицию обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, две отдельных композиции включают композицию обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, две

отдельных композиции включают композицию обогащенных CD57- CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, две отдельных композиции обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток и обогащенные CD57- CD8+ Т-клетки раздельно инкубируют в условиях стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, одну композицию обогащенных Т-клеток инкубируют в условиях стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, одной композицией является композиция обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, одной композицией является композиция обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, одной композицией является композиция обогащенных CD57- CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, одной композицией является композиция обогащенных CD57- CD4+ и CD57- CD8+ Т-клеток, которые были объединены из отдельных композиций до инкубирования.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток, которую инкубируют в условиях стимулирования, включает, по меньшей мере, точно или примерно 60%,по меньшей мере, точно или примерно 65%,по меньшей мере, точно или примерно 70%,по меньшей мере, точно или примерно 75%, по меньшей мере, точно или примерно 80%, по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 98%, по меньшей мере, точно или примерно 99%, по меньшей мере, точно или примерно 99,5%, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% или точно или примерно 100% CD57- CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток, которую инкубируют в условиях стимулирования, включает менее чем или примерно 40%, менее чем или примерно 35%, менее чем или примерно 30%, менее чем или примерно 25%, менее чем или примерно 20%, менее чем или примерно 15%, менее чем или примерно 10%, менее чем или примерно 5%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% Т-клеток, положительных для CD57 экспрессии или отрицательных для CD4 экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток, которую инкубируют в условиях стимулирования, включает, по меньшей мере, точно или примерно 60%,по меньшей мере, точно или примерно 65%,по меньшей мере, точно или примерно 70%,по меньшей мере, точно или примерно 75%, по меньшей мере, точно или примерно 80%, по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 98%, по меньшей мере, точно или примерно 99%, по меньшей мере, точно или примерно 99,5%, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% или точно или примерно 100% CD57- CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток, которую инкубируют в условиях стимулирования, включает менее чем или примерно 40%, менее чем или примерно 35%, менее чем или примерно 30%, менее чем или примерно 25%, менее чем или примерно

20%, менее чем или примерно 15%, менее чем или примерно 10%, менее чем или примерно 5%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% Т-клеток, которые положительны для CD57 экспрессии или отрицательны для CD8 экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, композиция обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток, которую инкубируют в условиях стимулирования, включает менее чем или примерно 40%, менее чем или примерно 35%, менее чем или примерно 30%, менее чем или примерно 25%, менее чем или примерно 20%, менее чем или примерно 15%, менее чем или примерно 10%, менее чем или примерно 5%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% Т-клеток, которые положительны для CD57 экспрессии или отрицательны для CD8 экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD57- CD3+ Т-клеток, которую инкубируют в условиях стимулирования, включает, по меньшей мере, точно или примерно 60%,по меньшей мере, точно или примерно 65%,по меньшей мере, точно или примерно 70%,по меньшей мере, точно или примерно 75%, по меньшей мере, точно или примерно 80%, по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 98%, по меньшей мере, точно или примерно 99%, по меньшей мере, точно или примерно 99,5%, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% или точно или примерно 100% CD57- CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция обогащенных CD57- CD3+ Т-клеток, которую инкубируют в условиях стимулирования, включает менее чем или примерно 40%, менее чем или примерно 35%, менее чем или примерно 30%, менее чем или примерно 25%, менее чем или примерно 20%, менее чем или примерно 15%, менее чем или примерно 10%, менее чем или примерно 5%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% Т-клеток, которые положительны для CD57 экспрессии или отрицательны для CD3 экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления, отдельные композиции обогащенных CD57-CD4+ и CD57-CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию и инкубируют в условиях стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, отдельные стимулированные композиции обогащенных CD57-CD4+ и обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток и/или завершения инкубирования.

В некоторых вариантах осуществления, инкубирование в условиях стимулирования может включать культивирование, культивирование, стимулирование, активацию, размножение, включая инкубирование в присутствии условия стимулирования, например, условиях, созданных для индуцирования пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для примирования клеток для генетического конструирования, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора. В конкретных вариантах осуществления, условия стимулирования могут включать одну или более конкретных сред, температур,

содержания кислорода, содержания двуокиси углерода, времени, агентов, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиком, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры связывания, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, созданные для активации клеток.

В некоторых аспектах, стимулирование и/или инкубирование в условиях стимулирования проводят в соответствии с методами, такими как описаны в патенте США № 6,040,177 от Riddell et al., Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakuraet al. (2012) Blood,1:72-82 и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления, CD57- Т-клетки размножают добавлением в композицию для инициации культивирования питающих клеток, таких как не делящиеся мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), (например, так, что получаемая популяция клеток содержит, по меньшей мере, примерно 5, 10, 20 или 40 или более питающих клеток PBMC для каждого Т лимфоцита в исходной размножаемой популяции); и инкубированием культуры (например, в течение времени, достаточного для увеличения количества Т-клеток). В некоторых аспектах, не делящиеся питающие клетки могут содержать гамма-облученные питающие клетки PBMC. В некоторых вариантах осуществления, PBMC облучают гамма лучами в интервале примерно 3000-3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах, питающие клетки добавляют к культуральной среде до добавления популяций Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, условия стимулирования включают температуру, подходящую для роста Т лимфоцитов человека, например, по меньшей мере, примерно 25°C, обычно, по меньшей мере, примерно 30 градусов, и обычно, точно или примерно 37°C. В некоторых вариантах осуществления, во время культивирования проводят сдвиг температуры, например, от 37°C до 35°C. Необязательно, инкубирование может дополнительно включать добавление не делящихся EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве питающих клеток. LCL могут быть облучены гамма лучами в интервале примерно 6000-10000 рад. LCL питающие клетки в некоторых аспектах представлены в любом подходящем количестве, так, чтобы отношение LCL питающих клеток к исходным Т лимфоцитам составляло, по меньшей мере, примерно 10:1.

В конкретных вариантах осуществления, условия стимулирования включают инкубирование, культивирование и/или культивирование клеток со стимулирующим реагентом. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующим реагентом является реагент, описанный в разделе III.A.1. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит или включает гранулы. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит или включает олигомерный реагент, например, олигомерный реагент на основе мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, начало и/или инициация инкубирования, культивирования и/или культивирования клеток в условиях стимулирования возникает, когда клетки

контактируют с и/или инкубируют со стимулирующим реагентом. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют до, во время и/или после генетического конструирования клеток, например, введения рекомбинантного полинуклеотида в клетки, такого как трансдукция или трансфекция. В некоторых вариантах осуществления, композицию обогащенных Т-клеток инкубируют при отношении стимулирующего реагента и/или гранул к клеткам точно или примерно 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, отношение стимулирующего реагента и/или гранул к клеткам составляет от 2,5:1 до 0,2:1, от 2:1 до 0,5:1, от 1,5:1 до 0,75:1, от 1,25:1 до 0,8:1, от 1,1:1 до 0,9:1. В конкретных вариантах осуществления, отношение стимулирующего реагента к клеткам составляет примерно 1:1 или равно 1:1.

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

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, клетки входной популяции, стимулируют или подвергают стимулированию, например, культивируют в условиях стимулирования, например в присутствии стимулирующего реагента, с плотностью, составляющей, составляющей примерно или, по меньшей мере, $0{,}01\times10^6$ клеток/мл, $0{,}1\times10^6$ клеток/мл, $0{,}5\times10^6$ клеток/мл, $1{,}0\times10^6$ клеток/мл, $1{,}5\times10^6$ клеток/мл, $2{,}0\times10^6$ клеток/мл, $2{,}5\times10^6$ клеток/мл, $3{,}0\times10^6$ клеток/мл, $4{,}0\times10^6$ клеток/мл, $5{,}0\times10^6$ клеток/мл, 10×10^6 клеток/мл или 50×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, клетки входной популяции, стимулируют или подвергают стимулированию, например, культивируют в условиях стимулирования, например в присутствии стимулирующего реагента, с плотностью, составляющей, составляющей примерно или, по меньшей мере, $3{,}0\times10^6$ клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, входные клетки являются жизнеспособными клетками.

В некоторых вариантах осуществления, композиции или клетки инкубируют в присутствии условия стимулирования или стимулирующего агента. Такие условия включают условия, созданные для индуцирования пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для примирования клеток для генетического конструирования, такого как введение рекомбинантного антигенного рецептора. Типовые стимулирующие реагенты описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубирования в присутствии одного или более условий стимулирования или стимулирующих агентов проводят во внутренней полости центрифужной камеры, например, при центробежном

вращении, так, как описано в международной публикации номер WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубирования проводят в центрифужной камере включает смешивание с реагентом или реагентами для индуцирования стимулирования и/или активации. В некоторых вариантах осуществления, клеток, такие как выбранные клетки, смешивают в условиях стимулирования или со стимулирующим агентом в центрифужной камере. В некоторых аспектах таких процессов, объем клеток смешивают с количеством одного или более условий стимулирования или агентов, которое значительно меньше обычно применяемого при проведении подобного стимулирования в планшете для культивирования клеток или другой системе.

В некоторых вариантах осуществления, агент стимулирования добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое по существу меньше, чем (например, составляет не более чем 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% количества) количество агента стимулирования, которое обычно используют или может быть необходимым для достижения примерно такой же или подобной эффективности селектирования того же количества клеток или того же объема клеток при проведении селектирования без смешивания в центрифужной камере, например, в пробирке или пакете при периодическом встряхивании или вращении. В некоторых вариантах осуществления, инкубирование проводят с добавлением буфера инкубирования к клеткам и агенту стимулирования для достижения целевого объема с инкубированием реагента, например, от 10 мл до 200 мл, например, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, или примерно или 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 150 мл или 200 мл. В некоторых вариантах осуществления, буфер инкубирования и агент стимулирования предварительно смешивают до добавления к клеткам. В некоторых вариантах осуществления, буфер инкубирования и агент стимулирования по отдельности добавляют к клеткам. В некоторых вариантах осуществления, стимулирование инкубированием проводят при периодическом осторожном перемешивании, что может помочь в способствовании энергетически благоприятных взаимодействий, и тем самым позволяет применять меньшее общее количество агента стимулирования при достижении стимулирования и активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления, инкубирование обычно проводят в условиях смешивания, таких как в присутствии вращения при относительно низкой силе или скорости, такой как скорость ниже чем та, которую применяют для осаждения клеток центрифугированием, например, от или от примерно 600 об./мин. до 1700 об./мин. (например точно или примерно или, по меньшей мере, 600 об./мин., 1000 об./мин. или 1500 об./мин. или 1700 об./мин.), например, при RCF на образце или стенке камеры или другого контейнера от или от примерно 80g до 100g (например точно или примерно или, по меньшей мере, 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах осуществления, вращение проводят с применением повторяющихся интервалов вращения при такой низкой скорости с последующим периодом отдыха, например, при вращении и/или

отдыхе в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например при вращении в течение приблизительно 1 или 2 секунд с последующим отдыхом в течение приблизительно 5, 6, 7 или 8 секунд.

В некоторых вариантах осуществления, общая длительность инкубирования, например с агентом стимулирования, составляет от или от примерно 1 часа до 96 часов, 1 часа и 72 часов, 1 часа и 48 часов, 4 часов и 36 часов, 8 часов и 30 часов или 12 часов и 24 часов, например, по меньшей мере, или примерно по меньшей мере, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов или 72 часа. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное инкубирование проводят в течение от или примерно от 1 часа до 48 часов, 4 часов и 36 часов, 8 часов и 30 часов или 12 часов и 24 часов, включительно.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирование, например культивирование клеток в условиях стимулирования, проводят в течение, в течение примерно или в течение менее чем, 48 часов, 42 часов, 36 часов, 30 часов, 24 часов, 22 часов, 20 часов, 18 часов, 16 часов или 12 часов. В некоторых вариантах осуществления, стимулирование например культивирование клеток в условиях стимулирования, проводят в течение 20 ± 4 часов или от или от примерно 16 часов до 24 часов. В конкретных вариантах осуществления, стимулирование, например культивирование клеток в условиях стимулирования, проводят в течение от или от примерно 36 часов до 12 часов, 30 часов и 18 часов или в течение или в течение примерно 24 часов или 22 часов. В некоторых вариантах осуществления, стимулирование, например культивирование клеток в условиях стимулирования, проводят в течение, в течение примерно или в течение менее чем, 2 дней или одного дня.

В конкретных вариантах осуществления, количество, составляющее, составляющее примерно или составляющее, 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 или $1{,}000\times10^6$ клеток входной популяции стимулируют или подвергают стимулированию, например, культивируют в условиях стимулирования. В конкретных вариантах осуществления, количество входной популяции, которое стимулируют, например, культивируют в условиях стимулирования, составляет точно или примерно 50×10^6 клеток, точно или примерно 100×10^6 клеток, точно или примерно 150×10^6 клеток, точно или примерно 200×10^6 клеток, точно или примерно 250×10^6 клеток, точно или примерно 300×10^6 клеток, точно или примерно 350×10^6 клеток, точно или примерно 400×10^6 клеток, точно или примерно 450×10^6 клеток, точно или примерно 500×10^6 клеток, точно или примерно 550×10^6 клеток, точно или примерно 600×10^6 клеток, точно или примерно 700×10^6 клеток, точно или примерно 800×106 клеток, точно или примерно 900×10^6 клеток или точно или примерно 1000×10^6 клеток или любое значения в пределах вышеуказанных. В конкретных вариантах осуществления, количество, составляющее или составляющее примерно 900×10^6 клеток входной популяции стимулируют, например, культивируют в условиях стимулирования.

В конкретных вариантах осуществления, входная композиция содержит

жизнеспособные CD4+ Т-клетки и жизнеспособные CD8+ Т-клетки, при отношении от 1:10 до 10:1, от 1:5 до 5:1, от 4:1 до 1:4, от 1:3 до 3:1, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,25:1 до 1:1,25, от 1,2:1 до 1:1,2, от 1,1:1 до 1:1,1, или примерно 1:1 или 1:1 жизнеспособных CD4+ Т-клеток к жизнеспособным CD8+ Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления, входная композиция содержит жизнеспособные CD4+ Т-клетки и жизнеспособные CD8+ Т-клетки, при отношении примерно 1:1 или 1:1 жизнеспособных CD4+ Т-клеток к жизнеспособным CD8+ Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления, количество, составляющее или составляющее примерно 450×10^6 CD4+ клеток входной популяции стимулируют, например, культивируют в условиях стимулирования. В конкретных вариантах осуществления, количество, составляющее или составляющее примерно 450×10^6 CD8+ клеток входной популяции стимулируют, например, культивируют в условиях стимулирования. В конкретных вариантах осуществления, количество, составляющее или составляющее примерно 450×10^6 CD4+ Т-клеток и количество, составляющее или составляющее примерно 450×10^6 CD8+ Т-клеток входной популяции стимулируют, например, культивируют в условиях стимулирования.

В конкретных вариантах осуществления, условия стимулирования включают инкубирование, культивирование и/или культивирование композиции обогащенных Т-клеток с и/или в присутствии одного или более цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов являются рекомбинантными цитокинами. В некоторых вариантах осуществления, один или более цитокинов являются рекомбинантными цитокинами человека. В некоторых вариантах осуществления, один или более цитокинов связываются с и/или способны связываться с рецепторами, которые экспрессированы и/или являются эндогенными к Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов является или включает член 4-альфа-спираль-связанного семейства цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, члены 4-альфа-спираль-связанного семейства цитокинов включают, но не ограничены ими, 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 более цитокинов является или включает IL-15. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов является или включает IL-7. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов является или включает IL-2.

В некоторых вариантах осуществления, количество или концентрацию одного или более цитокинов измеряют и/или количестве измеряют в международных единицах (IU). Международные единицы могут применяться для количественной оценки витаминов, гормонов, цитокинов, вакцин, продуктов крови и подобных биологически активных веществ. В некоторых вариантах осуществления, IU являются или включают единицы измерения эффективности биологических препаратов через сравнение с международным эталонным стандартом удельного веса и силы, например, WHO 1st International Standard

для IL-2 человека, 86/504. Международные единицы являются единственным признанным и стандартизированным способом описания единиц биологической активности, которые опубликован и получен стараниями Международного центра совместных исследований. В конкретных вариантах осуществления, IU для популяции, образца или источника цитокина могут быть получены через сравнительное тестирование продукта с аналогичным стандартным продуктом WHO. Например, в некоторых вариантах осуществления, IU/мг популяции, образца или источника рекомбинантный IL-2, IL-7 или IL-15 человека сравнивают с WHO стандартным продуктом IL-2 (код NIBSC: 86/500), WHO стандартным IL-17 продуктом (код NIBSC: 90/530) и WHO стандартным IL-15 продуктом (код NIBSC: 95/554), соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, биологическая активность в IU/мг эквивалентна (ED50 в нг/мл)$^{-1}\times10^{6}$. В конкретных вариантах осуществления, ED50 рекомбинантного IL-2 или IL-15 человека эквивалентна концентрации, требуемой для полумаксимального стимулирования пролиферации клеток (XTT расщепление) с CTLL-2 клетками. В некоторых вариантах осуществления, ED50 рекомбинантного IL-7 человека эквивалента концентрации, требуемой для полумаксимального стимулирования пролиферации PHA-активированных лимфоцитов периферической крови человека. Подробное описание анализов и расчетов IU для IL-2 представлено 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; подробное описание анализов и расчетов IU для IL-15 представлено в Soman et al. Journal of Immunological Methods (2009) 348 (1-2): 83-94.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, входные клетки, стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии цитокина, например, рекомбинантного цитокина человека, в концентрации от 1 IU/мл до 1000 IU/мл, от 10 IU/мл до 50 IU/мл, от 50 IU/мл до 100 IU/мл, от 100 IU/мл до 200 IU/мл, от 100 IU/мл до 500 IU/мл, от 250 IU/мл до 500 IU/мл или от 500 IU/мл до 1000 IU/мл.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, входные клетки, стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии рекомбинантного IL-2, например, рекомбинантного IL-2 человека, в концентрации от 1 IU/мл до 500 IU/мл, от 10 IU/мл до 250 IU/мл, от 50 IU/мл до 200 IU/мл, от 50 IU/мл до 150 IU/мл, от 75 IU/мл до 125 IU/мл, от 100 IU/мл до 200 IU/мл или от 10 IU/мл до 100 IU/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, клетки входной популяции, стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии рекомбинантного IL-2 в концентрации точно или примерно 50 IU/мл, 60 IU/мл, 70 IU/мл, 80 IU/мл, 90 IU/мл, 100 IU/мл, 110 IU/мл, 120 IU/мл, 130 IU/мл, 140 IU/мл, 150 IU/мл, 160 IU/мл, 170 IU/мл, 180 IU/мл, 190 IU/мл или 100 IU/мл. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, входные клетки, стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 100 IU/мл рекомбинантного IL-2, например, рекомбинантного IL-2 человека.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, входные клетки,

стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии рекомбинантного IL-7, например, рекомбинантного IL-7 человека, в концентрации от 100 IU/мл до 2000 IU/мл, от 500 IU/мл до 1000 IU/мл, от 100 IU/мл до 500 IU/мл, от 500 IU/мл до 750 IU/мл, от 750 IU/мл до 1000 IU/мл или от 550 IU/мл до 650 IU/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, входные клетки, стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии IL-7 в концентрации точно или примерно 50 IU/мл,100 IU/мл, 150 IU/мл, 200 IU/мл, 250 IU/мл, 300 IU/мл, 350 IU/мл, 400 IU/мл, 450 IU/мл, 500 IU/мл, 550 IU/мл, 600 IU/мл, 650 IU/мл, 700 IU/мл, 750 IU/мл, 800 IU/мл, 750 IU/мл, 750 IU/мл, 750 IU/мл или 1000 IU/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, входные клетки, стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 600 IU/мл рекомбинантного IL-7, например, рекомбинантного IL-7 человека.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, входные клетки, стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии рекомбинантного IL-15, например, рекомбинантного IL-15 человека, в концентрации от 1 IU/мл до 500 IU/мл, от 10 IU/мл до 250 IU/мл, от 50 IU/мл до 200 IU/мл, от 50 IU/мл до 150 IU/мл, от 75 IU/мл до 125 IU/мл, от 100 IU/мл до 200 IU/мл или от 10 IU/мл до 100 IU/мл. В конкретных вариантах осуществления, клеток, например, клетки, например, входные клетки, стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии рекомбинантного IL-15 в концентрации точно или примерно 50 IU/мл, 60 IU/мл, 70 IU/мл, 80 IU/мл, 90 IU/мл, 100 IU/мл, 110 IU/мл, 120 IU/мл, 130 IU/мл, 140 IU/мл, 150 IU/мл, 160 IU/мл, 170 IU/мл, 180 IU/мл, 190 IU/мл или 200 IU/мл. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, входные клетки, стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 100 IU/мл рекомбинантного IL-15, например, рекомбинантного IL-15 человека.

В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, входные клетки, стимулируют или подвергают стимулированию в условиях стимулирования 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 некоторых вариантах осуществления, IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются человеческими. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов являются или включают рекомбинантный IL-2, IL-7 и/или IL-15 человека. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в условиях стимулирования в присутствии рекомбинантного IL-2, IL-7 и IL-15. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в условиях стимулирования в присутствии рекомбинантного IL-2 в количестве или в количестве примерно 100 IU/мл, рекомбинантного IL-7 в количестве или в количестве примерно 600 IU/мл и рекомбинантный IL-15 в количестве или в количестве примерно 100 IU/мл.

Условия могут включать одну или более конкретных сред, температур, содержания кислорода, содержания двуокиси углерода, времени, агентов, например, питательных

веществ, аминокислот, антибиотиков и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры связывания, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, созданные для активации клеток.

В некоторых аспектах, стимулирование проводят в соответствии с методами, такими как описаны в патенте США № 6,040,1 77 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.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирование проводят в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда является определенной и/или хорошо определенной средой для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточной средой является контролируемая культуральная среда, которая обработана, например, отфильтрована для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит белки. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда может содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы прикрепления.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирование проводят в бессывороточной среде, описанной в настоящем документе или в PCT/US2018/064627. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит минимальную среду (например, OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Media (ThermoFisher)), с добавление одной или более добавок. В некоторых вариантах осуществления, одна или более добавок являются бессывороточными. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит минимальную среду с добавлением одного или более дополнительных компонентов для сохранения, размножения и/или активации клеток (например, Т-клеток), таких, как представлены дополнительной добавкой (например OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (ThermoFisher)). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит добавку для замены сыворотки, например, замены сыворотки для иммунных клеток, например, ThermoFisher, #A2596101, CTS™ Immune Cell Serum Replacement или замены сыворотки для иммунных клеток, описанной у Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит свободную форму аминокислоты, такой как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит дипептидную форму L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина), такую как дипептид в Glutamax™ (ThermoFisher). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит один или более рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный IL-2 человека, рекомбинантный IL-7 человека и/или рекомбинантный IL-15 человека. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть стимулирования в присутствии одного или более условий стимулирования или стимулирующего реагента проводят во внутренней полости центрифужной камеры, например, при центробежном вращении, так,

как описано в международной публикации номер WO2016/073602, которая включена в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть стимулирования проводят в центрифужной камере включает смешивание с реагентом или реагентами для индуцирования стимулирования и/или активации. В некоторых вариантах осуществления, клетки, такие как выбранные клетки, смешивают с условием стимулирования или стимулирующим агентом в центрифужной камере. В некоторых аспектах таких способов, объем клеток смешивают с количеством одного или более условий стимулирования или агентов, которые намного меньше, чем обычно применяются при проведении подобного стимулирования в планшете для культивирования клеток или другой системы.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирование обычно проводят в условиях смешивания, например, в присутствии вращения, обычно при относительно низкой силе или скорости, например, скорости ниже, чем применяют для осаждения клеток центрифугированием, например, от или от примерно 600 об./мин. до 1700 об./мин. (например точно или примерно или, по меньшей мере, 600 об./мин., 1000 об./мин. или 1500 об./мин. или 1700 об./мин.), например, при RCF на образце или стенке камеры или другого контейнера от или от примерно 80g до 100g (например точно или примерно или, по меньшей мере, 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляют с применением повторяющихся интервалов вращения при такой низкой скорости с последующим периодом отдыха, например, при вращении и/или отдыхе в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, при вращении в течение приблизительно 1 или 2 секунд с последующим отдыхом в течение приблизительно 5, 6, 7 или 8 секунд.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирование проводят в статических условиях, таких как условия, которые не включают центрифугирование, встряхивание, вращение, взбалтывание или перфузию, например, непрерывную или полунепрерывную перфузию среды. В некоторых вариантах осуществления, либо до, либо непосредственно после, например, в пределах 5, 15 или 30 минут, инициации клетки переносят (например, переносят в стерильных условиях) в контейнер, такой как пакет или флакон, и помещают в инкубатор. В конкретных вариантах осуществления, инкубатор устанавливают на примерно или, по меньшей мере, 16°C, 24°C или 35°C. В некоторых вариантах осуществления, инкубатор устанавливают на 37°C, на примерно 37°C или 37°C ± 2°C, ± 1°C, ± 0,5°C или ± 0,1°C. В конкретных вариантах осуществления, стимулирование в статических условиях проводят в пакете для культивирования клеток, помещенном в инкубатор. В некоторых вариантах осуществления, пакет для культивирования состоит из однослойной полиолефиновой газопроницаемой пленки, которая позволяет моноцитам, если присутствуют, прилипать к поверхности пакета.

В конкретных аспектах, способы применяют обратимые системы, в которых, по меньшей мере, один реагент (*например*, аффинный реагент или стимулирующий реагент), способный связываться с молекулой на поверхности клетки (молекулы клеточной

поверхности), обратимо ассоциирован с реагентом (например, аффинным реагентом или стимулирующим реагентом). В некоторых случаях, реагент содержит множество сайтов связывания, способных обратимо связываться с реагентом (*например*, аффинным реагентом или стимулирующим реагентом). В некоторых случаях, реагентом (например, аффинным реагентом или стимулирующим реагентом) является реагент мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один реагент (*например*, аффинный реагент или стимулирующий реагент) содержит, по меньшей мере, один сайт связывания B, который специфически связывает эпитоп или область молекулы, и также содержит партнер связывания C, который специфически связывается с, по меньшей мере, один сайт связывания Z реагента (например, аффинного реагента или стимулирующего реагента). В некоторых случаях, связывающее взаимодействие между партнером связывания C и, по меньшей мере, одним сайтом связывания Z является не ковалентным взаимодействием. В некоторых вариантах осуществления, связывающее взаимодействие, такое как не ковалентное взаимодействие, между партнером связывания C и, по меньшей мере, одним сайтом связывания Z, является обратимым.

В некоторых вариантах осуществления, обратимая ассоциация может быть опосредована в присутствии вещества, такого как конкурирующий реагент, который является или содержит сайт связывания, который также способен связываться с, по меньшей мере, одним сайтом связывания Z. В общем, вещество (*например,* конкурирующий реагент) может действовать как конкурент из-за более высокой аффинности связывания для сайта связывания Z, присутствующего в реагенте, и/или из-за присутствия в более высоких концентрациях, чем партнер связывания C, тем самым отсоединяя и/или диссоциирования партнера связывания C от реагента. В некоторых вариантах осуществления, аффинность вещества (*например,* конкурирующего реагента) для, по меньшей мере, одного сайта связывания Z, больше, чем аффинность партнера связывания C агента (*например*, аффинного реагента или стимулирующего реагента) для, по меньшей мере, одного сайта связывания Z. Таким образом, в некоторых случаях, связь между сайтом связывания Z реагента и партнером связывания C реагента (*например*, аффинного реагента или стимулирующего реагента) может быть разорвана добавлением вещества (*например,* конкурирующего реагента), тем самым сохраняя ассоциацию реагента (*например*, аффинного реагента или стимулирующего реагента) и реагента (например, аффинного реагента или стимулирующего реагента) обратимой.

Реагенты, которые могут применяться в таких обратимых системах, описаны и известны в данной области техники, см., *например*, патенты США №№ 5,168,049; 5,506,121; 6,103,493; 7,776,562; 7,981,632; 8,298,782; 8,735,540; 9,023,604; и опубликованных международных заявках PCT №№ WO2013/124474 и WO2014/076277. Не ограничивающие примеры реагентов и партнеров связывания, способных образовывать обратимое взаимодействие, а также веществ (*например,* конкурирующих агентов), способных обращать такое связывание, описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирование дает активацию и/или

пролиферацию клеток, например, до трансдукции.

1. Стимулирующие реагенты

В конкретных вариантах осуществления, условия стимулирования включают инкубирование, культивирование и/или культивирование клеток со стимулирующим реагентом. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит или включает гранулы. В некоторых вариантах осуществления, инициация стимулирования происходит, когда клетки инкубируют или контактируют со стимулирующим реагентом. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит или включает олигомерный реагент, например, олигомер мутеина стрептавидина. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент активирует и/или способен активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и/или один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул.

В некоторых вариантах осуществления, условия стимулирования или стимулирующие реагенты включают один или более агентов, например, лигандов, которые способны активировать внутриклеточный сигнальный домен TCR комплекс. В некоторых вариантах осуществления, агент, рассматриваемый в настоящем документе, могут включать, но не ограничены ими, РНК, ДНК, белки (например, ферменты), антигены, поликлональные антитела, моноклональные антитела, фрагменты антитела, углеводы, жиры лектины или любые другие биомолекулы с аффинностью для желаемой мишени. В некоторых вариантах осуществления, желаемой мишенью является Т-клеточный рецептор и/или компонент Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, желаемой мишенью является CD3. В определенном варианте осуществления, желаемой мишенью является костимулирующая молекула Т-клетки, например, CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. один или более агентов могут быть присоединены прямо или косвенно к гранулам множеством известных способов. Присоединение может быть ковалентным, нековалентным, электростатическим или гидрофобным, и может осуществляться с применением множества средств, включая, например, химические средства, механические средства или ферментные средства. В некоторых вариантах осуществления, агентом является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab. В некоторых вариантах осуществления, биомолекула (например, биотинилированное анти-CD3 антитело) может быть присоединена косвенно к грануле через другую биомолекулу (например, анти-биотиновое антитело), которое прямо присоединено к грануле.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит один или более агентов (например, антител), которые присоединены к грануле (например, парамагнитной грануле) и специфически связываются с одной или более следующими макромолекулами на клетке (например, Т-клетке): CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-1), CD127, MHCI, MHCII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L,

LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL- 10R, CD18/CDl la (LFA-1), CD62L (L-селектин), CD29/CD49d (VLA-4), Notch лиганд (например, дельта-подобный 1/4, Jagged 1/2, и т.д.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 и CXCR3 или их фрагменты, включая соответствующие лиганды к этим макромолекулам или их фрагментам. В некоторых вариантах осуществления, агент (например антитело), присоединенный к грануле, специфически связывается с одной или более из следующих макромолекул на клетке (например, Т-клетке): CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO.

В некоторых вариантах осуществления, одним или более агентами, присоединенными к грануле, является антитело. Антитело может включать поликлональное антитело, моноклональное антитело (включая полноразмерные антитела, которые имеют Fc область иммуноглобулина), композиции антитела с полиэпитопной специфичностью, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, диатела и одноцепочечные молекулы, а также фрагменты антитела (например, Fab, F(ab')2 и Fv). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующим реагентом является фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), например, Fab, Fab′-SH, Fv, scFv или (Fab′)2 фрагмент. Должно быть понятно, что постоянные области любого изотипа могут применяться для антител, рассматриваемых в настоящем документе, включая IgG, IgM, IgA, IgD и IgE константные области, и что такие константные области могут быть получены от любого вида человека или животного (например, видов мышей).

В некоторых вариантах осуществления, агентом является антитело, которое связывается и/или распознает один или более компонентов Т-клеточного рецептора. В конкретных вариантах осуществления, агентом является анти-CD3 антитело. В некоторых вариантах осуществления, агентом является антитело, которое связывается с и/или распознает корецептор. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит анти-CD28 антитело. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит анти-CD28 антитело и анти-CD3 антитело. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит один или более стимулирующих агентов. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит первичный и вторичный стимулирующий агент. В некоторых вариантах осуществления, первым стимулирующим агентом является анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например как описано в настоящем документе, и вторым стимулирующим агентом является анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, первым стимулирующим агентом является анти-CD3 Fab, например как описано в настоящем документе, и вторым стимулирующим агентом является анти-CD28 Fab, например как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, клетки входной композиции, стимулируют в присутствии отношения стимулирующего реагента к клеткам точно или примерно 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, отношение стимулирующего реагента к клеткам составляет от 2,5:1 до 0,2:1, от 2:1 до 0,5:1, от 1,5:1 до 0,75:1, от 1,25:1 до 0,8:1, от 1,1:1 до 0,9:1. В конкретных вариантах осуществления, отношение стимулирующего реагента к клеткам составляет примерно 1:1 или составляет 1:1. В конкретных вариантах осуществления, отношение стимулирующего реагента к клеткам составляет примерно 0,3:1 или составляет 0,3:1. В конкретных вариантах осуществления, отношение стимулирующего реагента к клеткам составляет примерно 0,2:1 или составляет 0,2:1.

В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют в присутствии, примерно или, по меньшей мере, 0,01 мкг, 0,02 мкг, 0,03 мкг, 0,04 мкг, 0,05 мкг, 0,1 мкг, 0,2 мкг, 0,3 мкг, 0,4 мкг, 0,5 мкг, 0,75 мкг, 1 мкг, 2 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг, 6 мкг, 7 мкг, 8 мкг, 9 мкг или 10 мкг стимулирующего реагента на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют в присутствии или примерно 4 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 3 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 2,5 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют, подвергают стимулированию в присутствии или примерно 2 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 1,8 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 1,6 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 1,4 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 1,2 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 1 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют в присутствии или примерно 0,8 мкг на 10^6 клеток. В разных вариантах осуществления, клетки стимулируют в присутствии или примерно 0,8 мкг на 10^6 клеток.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент связывается с молекулой на поверхности клетки, где связывание между стимулирующим реагентом и молекулой способно индуцировать, доставлять или модулировать стимулирующий сигнал в клетках. В некоторых случаях, молекулой клеточной поверхности (например рецептор) является сигнальная молекула. В некоторых таких случаях, стимулирующий реагент способен специфически связываться с сигнальной молекулой, экспрессированной одной или более клетками-мишенями (например, Т-клетками). В некоторых случаях, стимулирующим реагентом является любой агент, который способен индуцировать или доставлять стимулирующий сигнал в клетку (например, Т-клетку) при связывании с молекулой клеточной поверхности, такой как рецептор. В некоторых вариантах

осуществления, стимулирующий сигнал может быть иммуностимулирующим, в этом случае стимулирующий агент способен вызывать, доставлять или модулировать сигнал, который вовлечен в, или который стимулирует иммунный ответ клетки (например, Т-клетки), например, повышает пролиферацию или размножение иммунной клетки, активацию иммунной клетки, дифференциацию иммунной клетки, секрецию цитокина, цитотоксическую активность или одну или более других функциональных активностей иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий сигнал может быть ингибирующим, в этом случае, стимулирующий реагент способен индуцировать, доставлять или модулировать стимулирующий сигнал в клетке (например, Т-клетке), которая вовлечена в, или которая ингибирует иммунный ответ, например, ингибирует или снижает пролиферацию или размножение иммунной клетки, активацию иммунной клетки, дифференциацию иммунной клетки, секрецию цитокина, цитотоксическую активность или одну или более других функциональных активностей иммунной клетки.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит первичный стимулирующий агент. В некоторых вариантах осуществления, первичный стимулирующий агент связывается с рецепторной молекулой на поверхности секретированных клеток образца. Таким образом, в некоторых случаях, первичный стимулирующий агент доставляет, вызывает или модулирует стимулирующий сигнал. В некоторых аспектах, доставка, индуцирование или модулирование стимулирующего сигнала первичным стимулирующим агентом вызывает стимулирование клеток. Таким образом, в некоторых случаях, первичный стимулирующий агент доставляет стимулирующий сигнал или обеспечивает первичный сигнал активации в клетки, тем самым стимулируя и/или активируя клетки. В некоторых вариантах осуществления, первичный стимулирующий агент дополнительно вызывает снижение маркера селектирования. В настоящем документе, снижение может включать снижение экспрессии, например, поверхностноклеточной экспрессии, маркера селектирования по сравнению с более ранним моментом времени.

В некоторых вариантах осуществления, клетки-мишени (например, Т-клетки) содержат TCR/CD3 комплексы и костимулирующие молекулы, такие как CD28. В этом случае, первичный стимулирующий агент связывается с TCR/CD3 комплексом, тем самым доставляя стимулирующий сигнал (например, первичный сигнал, например, первичный сигнал активации) в Т-клетку, и вторичный стимулирующий агент связывается с костимулирующей CD28 молекулой. В конкретных аспектах, первичный стимулирующий агент и/или вторичный стимулирующий агент дополнительно вызывает снижение маркера селектирования (например, маркера селектирования, применяемого для иммобилизации клеток-мишеней (например, Т-клеток)).

В некоторых вариантах осуществления, первичный стимулирующий агент доставляет TCR/CD3 комплекс-ассоциированный стимулирующий сигнал (например, первичный сигнал) в клетку, например, Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, первичный стимулирующий агент специфически связывается с молекулой, содержащей

ммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. В некоторых аспектах, первичный стимулирующий агент специфически связывает CD3. В некоторых случаях, первичный стимулирующий агент, который специфически связывает CD3, может быть выбран из группы, состоящей из анти-CD3-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-CD3 антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-CD3-антитела и белковой CD3 связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. Двухвалентным фрагментом антитела может быть F(ab')2-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv фрагмент, а одновалентный фрагмент антитела может быть выбран из группы, состоящей из Fab фрагмента, Fv фрагмента и одноцепочечного Fv фрагмента (scFv). В некоторых случаях, белковой CD3 связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами может быть аптамер, мутеин на основе полипептида семейства липокалина, аналог антитела на основе глутатион-S-трансферазы, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллического каркаса, аднектин или авимер.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD3 Fab фрагмент может быть получен из CD3 связывающего моноклонального антитела, продуцированного гибридомой клеточной линии OKT3 (ATCC® CRL-8001™; см. также патент США № 4,361,549). Вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи анти-CD3 антитела OKT3 описаны в Arakawa et al J. Biochem. 120, 657-662 (1996) и содержат аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NOs: 93 и 94, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD3 Fab содержит CDR вариабельной тяжелой и легкой цепей, указанные в SEQ ID NOs: 93 и 94, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий агент содержит вторичный стимулирующий агент. В некоторых вариантах осуществления, вторичный стимулирующий агент связывается с молекулой на поверхности клетки, например, молекулой клеточной поверхности, например, рецепторной молекулой. В некоторых вариантах осуществления, вторичный стимулирующий агент способен улучшать, ослаблять или модифицировать стимулирующий сигнал, доставленный через молекулу, связанную с первым стимулирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления, вторичный стимулирующий агент доставляет, вызывает или модулирует стимулирующий сигнал, например, второй или дополнительный стимулирующий сигнал. В некоторых аспектах, вторичный стимулирующий агент улучшает или потенцирует стимулирующий сигнал, вызванный первичным стимулирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления, вторичный стимулирующий агент связывается со вспомогательной молекулой и/или может стимулировать или индуцировать вспомогательный или вторичный стимулирующий сигнал в клетке. В некоторых аспектах, вторичный стимулирующий агент связывается с костимулирующей молекулой и/или предоставляет костимулирующий сигнал.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий агент, который может содержать вторичный стимулирующий агент, связывается, например, специфически

связывается с вторичной молекулой, которая может быть костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, цитокиновым рецептором, хемокиновым рецептором, молекулой иммунной контрольной точки или членом семейства TNF или семейства TNF рецептора.

В некоторых вариантах осуществления, молекулой на клетке, например, Т-клетке, может быть CD28, и вторичный стимулирующий агент) специфически связывает CD28. В некоторых аспектах, вторичный стимулирующий агент, который специфически связывает CD28, может быть выбран из группы, состоящей из анти-CD28-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-CD28 антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-CD28-антитела и белковой CD28 связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. Двухвалентный фрагмент антитела может быть F(ab')2-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv фрагмент, а одновалентный фрагмент антитела может быть выбран из группы, состоящей из Fab фрагмента, Fv фрагмента и одноцепочечного Fv фрагмента (scFv). Белковая CD28 связывающей молекулой с антитело-подобными связывающими свойствами может быть аптамер, мутеин на основе полипептида семейства липокалина, аналог антитела на основе глутатион-S-трансферазы, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллического каркаса, аднектина и авимера.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD28 Fab фрагмент может быть получен из антитела CD28.3 (депонированного как синтетическая одноцепочечная Fv конструкция с номером доступа GenBank AF451974,1; см. также Vanhove et al, BLOOD, 15 July 2003, Vol. 102, No. 2, страницы 564-570), вариабельные тяжелые и легкие цепи которого содержат SEQ ID NO: 91 и 92, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD28 Fab содержит CDR вариабельных тяжелой и легкой цепей, указанных в SEQ ID NOs:91 и 92, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, молекулой на клетке, *например*, Т-клетке, является CD90, и вторичный стимулирующий агент специфически связывает CD90. В некоторых аспектах, вторичный стимулирующий агент, который специфически связывает CD90, может быть выбран из группы, состоящей из анти-CD90-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-CD90 антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-CD90-антитела и белковой CD90 связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может быть получен из любого известного в данной области техники. См., *например,* анти-CD90 антитело G7 (Biolegend, кат. № 105201).

В некоторых вариантах осуществления, молекулой на клетке, *например*, Т-клетке, является CD95, и вторичный стимулирующий агент специфически связывает CD95. В некоторых аспектах, вторичный стимулирующий агент, который специфически связывает CD95, может быть выбран из группы, состоящей из анти-CD95-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-CD95 антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-CD95-антитела и белковой CD95 связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может быть получен из любого

известного в данной области техники. Например, в некоторых аспектах, анти-CD90 антитело может быть моноклональным анти-человеческим CD95 CH11 мыши (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) или может быть анти-CD95 mAb 7C11 или анти-APO-1, таким, как описано в Paulsen et al. Cell Death & Differentiation 18,4 (2011): 619-631.

В некоторых вариантах осуществления, молекулой на клетке, *например*, Т-клетке или В-клетке, может быть CD137, и вторичный стимулирующий агент специфически связывает CD137. В некоторых аспектах, вторичный стимулирующий агент, который специфически связывает CD137, может быть выбран из группы, состоящей из анти-CD137-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-CD137 антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-CD137-антитела и белковой CD137 связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может быть получен из любого известного в данной области техники. Например, анти-CD137 антителом может быть 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.

В некоторых вариантах осуществления, молекулой на клетке, *например,* В-клетке, может быть CD40, и вторичный стимулирующий агент специфически связывает CD40. В некоторых аспектах, вторичный стимулирующий агент, который специфически связывает CD40, может быть выбран из группы, состоящей из анти-CD40-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-CD40 антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-CD40-антитела и белковой CD40 связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами.

В некоторых вариантах осуществления, молекулой на клетке, *например*, Т-клетке, может быть CD40L (CD154), и вторичный стимулирующий агент специфически связывает CD40L. В некоторых аспектах, вторичный стимулирующий агент, который специфически связывает CD40L, может быть выбран из группы, состоящей из анти-CD40L-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-CD40L антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-CD40L-антитела и белковой CD40L связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может быть получен из любого известного в данной области техники. Например, анти-CD40L антителом в некоторых аспектах может быть Hu5C8, как описано у Blair et al. JEM vol. 191 no. 4 651-660. СМ. также, *например,* WO1999061065, US20010026932, US7547438, WO2001056603.

В некоторых вариантах осуществления, молекулой на клетке, *например*, Т-клетке, может быть индуцируемый Т-клеточный костимулятор (ICOS), и вторичный стимулирующий агент специфически связывает ICOS. В некоторых аспектах, вторичный стимулирующий агент, который специфически связывает ICOS, может быть выбран из группы, состоящей из анти-ICOS-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-ICOS антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-ICOS-антитела и белковой ICOS связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. Антитело или

антигенсвязывающий фрагмент может быть получен из любого известного в данной области техники. См., *например* US20080279851 и Deng et al. Hybrid Hybridomics. 2004 Jun;23(3):176-82.

В некоторых вариантах осуществления, молекулой на клетке, *например*, Т-клетке, может быть линкер для активации Т-клеток (LAT), и вторичный стимулирующий агент) специфически связывает LAT. В некоторых аспектах, вторичный стимулирующий агент, который специфически связывает LAT, может быть выбран из группы, состоящей из анти-LAT-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-LAT антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-LAT-антитела и белковой LAT связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может быть получен из любого известного в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, молекулой на клетке, *например*, Т-клетке, может быть CD27, и вторичный стимулирующий агент специфически связывает CD27. В некоторых аспектах, вторичный стимулирующий агент, который специфически связывает CD27, может быть выбран из группы, состоящей из анти-CD27-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-CD27 антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-CD27-антитела и белковой CD27 связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может быть получен из любого известного в данной области техники. См., *например,* WO2008051424.

В некоторых вариантах осуществления, молекулой на клетке, *например*, Т-клетке, может быть OX40, и вторичный стимулирующий агент специфически связывает OX40. В некоторых аспектах, вторичный стимулирующий агент, который специфически связывает OX40, может быть выбран из группы, состоящей из анти-OX40-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-OX40 антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-OX40-антитела и белковой OX40 связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может быть получен из любого известного в данной области техники. СМ., *например*, WO2013038191, Melero et al. Clin Cancer Res. 2013 Mar 1;19(5):1044-53.

В некоторых вариантах осуществления, молекулой на клетке, *например*, Т-клетке, может быть HVEM, и вторичный стимулирующий агент специфически связывает HVEM. В некоторых аспектах, вторичный стимулирующий агент, который специфически связывает HVEM, может быть выбран из группы, состоящей из анти-HVEM-антитела, двухвалентного фрагмента антитела анти-HVEM антитела, одновалентного фрагмента антитела анти-HVEM-антитела и белковой HVEM связывающей молекулы с антитело-подобными связывающими свойствами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может быть получен из любого известного в данной области техники. См., *например*, WO2006054961, WO2007001459, Park et al. Cancer Immunol Immunother. 2012 Feb;61(2):203-14.

В любом из указанных выше примеров, двухвалентным фрагментом антитела может быть (Fab)2'-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv фрагмент, а

одновалентный фрагмент антитела может быть выбран из группы, состоящей из Fab фрагмента, Fv фрагмента и одноцепочечного Fv фрагмента (scFv). В любом из указанных выше примеров, белковой связывающей молекулой с антитело-подобными связывающими свойствами может быть аптамер, мутеин на основе полипептида семейства липокалина, аналог антитела на основе глутатион-S-трансферазы, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллического каркаса, аднектин и авимер.

В некоторых аспектах, стимулирующий агент специфически таргетирует молекулу, экспрессированную на поверхности клеток-мишеней, где молекулой является TCR, химерный антигенный рецептор или молекула, содержащая иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Например, молекулу, экспрессированную на поверхности клетки-мишени, выбирают из комплекса Т-клетки или В-клетки с антигенным рецептором, CD3 цепи, CD3 дзета, антигенсвязывающий части Т-клеточного рецептора или В-клеточного рецептора или химерного антигенного рецептора. В некоторых случаях, стимулирующий агент таргетирует комплексы пептид:MHC I класса.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий агент связывается с His-меченым внеклеточным доменом молекулы, экспрессированной на поверхности клеток-мишеней. В некоторых случаях, стимулирующий агент содержит пептидную последовательность Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (также называемую Strep-tag® II, указанную в SEQ ID NO: 69), конъюгированную с никель-заряженным trisNTA (также называемым His-STREPPER или His/Strep-tag®II Adapter). В некоторых вариантах осуществления, молекулой, экспрессированной на поверхности клеток-мишеней, которые His-мечены, является CD19.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий агент специфически связывается с частью антитела рекомбинантного рецептора, *например*, CAR. В некоторых случаях, часть антитела рекомбинантного рецептора включает, по меньшей мере, часть иммуноглобулиновой константной области, такую как шарнирная область, *например*, IgG4 шарнирная область, и/или CH1/CL и/или Fc область. В некоторых вариантах осуществления, константной областью или частью является IgG человека, такой как IgG4 или IgG1. В некоторых случаях, реагент загружают αIgG, который распознает IgG4 спейсер.

В некоторых вариантах осуществления, желаемой мишенью является Т-клеточный рецептор и/или компонент Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, желаемой мишенью является CD3. В определенном варианте осуществления, желаемой мишенью является Т-клеточная костимулирующая молекула, например, CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

В некоторых вариантах осуществления, например, если стимулирующий агент не связан со стимулирующим реагентом или рецептор-связывающим реагентом, стимулирующим агентом является двухвалентный фрагмент антитела, $F(ab)_2$, или двухвалентный одноцепочечный Fv фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, если стимулирующий агент не связан с реагентом, стимулирующий агент не включает

партнер связывания С.

а. Гранулированные реагенты

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит частицы, например, гранулы, которые конъюгированы или связаны с одними или более агентами, например, биомолекулами, которые способны к активированинию и/или размножению клеток, например, Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, один или более агентов связаны с гранулами. В некоторых вариантах осуществления, гранулы являются биосовместимыми, т.е., состоит из материала, который подходит для биологического применения. В некоторых вариантах осуществления, гранулы являются нетоксичными к культивируемым клеткам, например, культивируемым Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления, гранулами могут быть любые частицы, которые способны присоединять агенты таким образом, который позволяет взаимодействие между агентом и клеткой.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит гранулу и одни или более агентов, которые прямо взаимодействуют с макромолекулой на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления, гранула (например, парамагнитная гранула) взаимодействует с клеткой через один или более агентов (например, антитело), специфических для одной или более макромолекул на клетке (например, одной или более клетках поверхностных белков). В некоторых вариантах осуществления, гранула (например, парамагнитная гранула) мечена первым агентом, описанным в настоящем документе, например, первичным антителом (например, анти-биотин антителом) или другой биомолекулой, и добавлен второй агент, такой как вторичное антитело (например, биотинилированное анти-CD3 антитело) или другая вторая биомолекула (например, стрептавидин), где вторичное антитело или другая вторичная биомолекула специфически связывается с такими первичными антителами или другой биомолекуле на частице.

В некоторых вариантах осуществления, гранула имеет диаметр более чем примерно 0,001 мкм, более чем примерно 0,01 мкм, более чем примерно 0,1 мкм, более чем примерно 1,0 мкм, более чем примерно 10 мкм, более чем примерно 50 мкм, более чем примерно 100 мкм или более чем примерно 1000 мкм и не более чем примерно 1500 мкм. В некоторых вариантах осуществления, гранула имеет диаметр примерно 1,0 мкм до примерно 500 мкм, примерно 1,0 мкм до примерно 150 мкм, примерно 1,0 мкм до примерно 30 мкм, примерно 1,0 мкм до примерно 10 мкм, примерно 1,0 мкм до примерно 5,0 мкм, примерно 2,0 мкм до примерно 5,0 мкм, или примерно 3,0 мкм до примерно 5,0 мкм. В некоторых вариантах осуществления, гранула имеет диаметр примерно 3 мкм до примерно 5мкм. В некоторых вариантах осуществления, гранула имеет диаметр по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или примерно 0,001 мкм, 0,01 мкм, 0,1мкм, 0,5мкм, 1,0 мкм, 1,5 мкм, 2,0 мкм, 2,5 мкм, 3,0 мкм, 3,5 мкм, 4,0 мкм, 4,5 мкм, 5,0 мкм, 5,5 мкм, 6,0 мкм, 6,5 мкм, 7,0 мкм, 7,5 мкм, 8,0 мкм, 8,5 мкм, 9,0 мкм, 9,5 мкм, 10 мкм, 12 мкм, 14 мкм, 16 мкм, 18 мкм или 20 мкм. В некоторых вариантах осуществления,

гранула имеет диаметр равный или примерно 4,5 мкм. В некоторых вариантах осуществления, гранула имеет диаметр равный или примерно 2,8 мкм.

В некоторых вариантах осуществления, гранулы имеют плотность более чем 0,001 g/cm^3, более чем 0,01 г/см^3, более чем 0,05 г/см^3, более чем 0,1 г/см^3, более чем 0,5 г/см^3, более чем 0,6 г/см^3, более чем 0,7 г/см^3, более чем 0,8 г/см^3, более чем 0,9 г/см^3, более чем 1 г/см^3, более чем 1,1 г/см^3, более чем 1,2 г/см^3, более чем 1,3 г/см^3, более чем 1,4 г/см^3, более чем 1,5 г/см^3, более чем 2 г/см^3, более чем 3 г/см^3, более чем 4 г/см^3 или более чем 5 г/см^3. В некоторых вариантах осуществления, гранулы имеют плотность от примерно 0,001 г/см^3 и примерно 100 г/см^3, примерно 0,01 г/см^3 и примерно 50 г/см^3, примерно 0,1 г/см^3 и примерно 10 г/см^3, примерно 0,1 г/см^3 и примерно,5 г/см^3, примерно 0,5 г/см^3 и примерно 1 г/см^3, примерно 0,5 г/см^3 и примерно 1,5 г/см^3, примерно 1 г/см^3 и примерно 1,5 г/см^3, примерно 1 г/см^3 и примерно 2 г/см^3, или примерно 1 г/см^3 и примерно 5 г/см^3. В некоторых вариантах осуществления, гранулы имеют плотность примерно 0,5 г/см^3, примерно 0,5 г/см^3, примерно 0,6 г/см^3, примерно 0,7 г/см^3, примерно 0,8 г/см^3, примерно 0,9 г/см^3, примерно 1,0 г/см^3, примерно 1,1 г/см^3, примерно 1,2 г/см^3, примерно 1,3 г/см^3, примерно 1,4 г/см^3, примерно 1,5 г/см^3, примерно 1,6 г/см^3, примерно 1,7 г/см^3, примерно 1,8 г/см^3, примерно 1,9 г/см^3, или примерно 2,0 г/см^3. В некоторых вариантах осуществления, гранулы имеют плотность примерно 1,6 г/см^3. В конкретных вариантах осуществления, гранулы или частицы имеют плотность примерно 1,5 г/см^3. В некоторых вариантах осуществления, частицы имеют плотность примерно 1,3 г/см^3

В некоторых вариантах осуществления, множество гранул имеют однородную плотность. В некоторых вариантах осуществления, однородная плотность имеет стандартное отклонение плотности менее чем 10%, менее чем 5% или менее чем 1% от средней плотности гранул.

В некоторых вариантах осуществления, гранула содержит, по меньшей мере, один материал на или рядом с поверхностью гранулы, который может сопрягаться, связываться или конъюгироваться с агентом. В некоторых вариантах осуществления, гранулы являются поверхностно функционализированными, т.е. содержит функциональные группы, которые способны формировать ковалентную связь со связывающими молекулами, например, олинуклеотидом или полипептидом. В конкретных вариантах осуществления, гранула содержит поверхностные карбоксильные, амино, гидроксидные, тозильные, эпокси и/или хлорметильные группы. В конкретных вариантах осуществления, гранулы содержат поверхностную агарозу и/или сефарозу. В некоторых вариантах осуществления, поверхность гранул содержит присоединенные стимулирующие реагенты, которые могут связываться или присоединяться к связывающим молекулам. В конкретных вариантах осуществления, биомолекулами являются полипептиды. В некоторых вариантах осуществления, гранулы содержат поверхностный белок A, белок G или биотин.

В некоторых вариантах осуществления, гранулы взаимодействуют в магнитном поле. В некоторых вариантах осуществления, гранулой является магнитная гранула. В

некоторых вариантах осуществления, магнитная гранула является парамагнитной. В конкретных вариантах осуществления, магнитная гранула является суперпарамагнитной. В некоторых вариантах осуществления, гранулы не демонстрируют какие-либо магнитные свойства, если они не повергаются воздействию магнитного поля.

В конкретных вариантах осуществления, гранула содержит магнитную сердцевину, парамагнитную сердцевину или суперпарамагнитную сердцевину. В некоторых вариантах осуществления, магнитная сердцевина содержит металл. В некоторых вариантах осуществления, металлом может быть, но не ограничен ими, железо, никель, медь, кобальт, гадолиний, марганец, тантал, цинк, цирконий или любое их сочетание. В некоторых вариантах осуществления, магнитная сердцевина содержит оксиды металлов (например, оксиды железа), ферриты (например, ферриты марганца, ферриты кобальта, ферриты никеля и т.д.), гематит и сплавы металлов (например, CoTaZn). В некоторых вариантах осуществления, магнитная сердцевина содержит один или более из феррита, металла, сплава металла, оксида железа или диоксида хрома. В некоторых вариантах осуществления, магнитная сердцевина содержит элементарное железо или его соединение. В некоторых вариантах осуществления, магнитная сердцевина содержит один или более из магнетита (Fe_3O_4), магемита (γFe_2O_3) или греидита (Fe_3S_4). В некоторых вариантах осуществления, внутренняя сердцевина содержит оксид железа (например, Fe_3O_4).

В некоторых вариантах осуществления, гранула содержит магнитную, парамагнитную и/или суперпарамагнитную сердцевину, которая покрыта поверхностно функционализированной оболочкой или покрытием. В некоторых вариантах осуществления, покрытие может содержать материал, который может включать, но не ограничен ими, полимер, полисахарид, диоксид кремния, жирную кислоту, белок, углерод, агарозу, сефарозу или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, полимером может быть полиэтиленгликоль, поли(молочная-со-гликолевая кислота), полиглутаральдегид, полиуретан, полистирол или поливиниловый спирт. В некоторых вариантах осуществления, внешняя оболочка или покрытие содержит полистирол. В конкретных вариантах осуществления, внешнее покрытие является поверхностно функционализированным.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит гранулу, которая содержит сердцевину из оксида металла (например, сердцевину из оксида железа) и покрытие, где сердцевина из оксида металла содержит, по меньшей мере, один полисахарид (например, декстран), и где покрытие содержит, по меньшей мере, один полисахарид (например, аминодекстран), по меньшей мере, один полимер (например, полиуретан) и двуокись кремния. В некоторых вариантах осуществления, сердцевина из оксида металла является сердцевиной из коллоидного оксида железа. В некоторых вариантах осуществления, один или более агентов включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления, один или более агентов включают анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело. В некоторых вариантах

осуществления, стимулирующий реагент содержит анти-CD3 антитело, анти-CD28 антитело и анти-биотин антитело. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит анти-биотин антитело. В некоторых вариантах осуществления, гранула имеет диаметр от примерно 3 мкм до примерно 10 мкм. В некоторых вариантах осуществления, гранула имеет диаметр от примерно 3 мкм до примерно 5 мкм. В некоторых вариантах осуществления, гранула имеет диаметр примерно 3,5 мкм.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит один или более агентов, которые присоединены к грануле, содержащей сердцевину из оксида металла (например, внутреннюю сердцевину из оксида железа) и покрытие (например, защитное покрытие), где покрытие содержит полистирол. В некоторых вариантах осуществления, гранулами являются монодисперсными, парамагнитными (например, суперпарамагнитными) гранулами, содержащими парамагнитную (например, суперпарамагнитную) железную сердцевину, например, сердцевину, содержащую магнетит (Fe_3O_4) и/или магемит (γFe_2O_3)с и полистирольную оболочку или покрытие. В некоторых вариантах осуществления, гранула является не пористой. В некоторых вариантах осуществления, гранулы содержат функционализированную поверхность, к которое присоединен один или более агентов. В некоторых вариантах осуществления, один или более агентов ковалентно связаны с гранулами на поверхности. В некоторых вариантах осуществления, один или более агентов включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, один или более агентов включают анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело. В некоторых вариантах осуществления, один или более агентов включают анти-CD3 антитело и/или анти-CD28 антитело и антитело или его антигенный фрагмент, способный связываться с меченым антителом (например, биотинилированным антителом), таким как меченое анти-CD3 или анти-CD28 антитело. В некоторых вариантах осуществления, гранулы имеют плотность примерно 1,5 г/см^3 и площадь поверхности от примерно 1 м^2/г до примерно 4 м^2/г. В конкретных вариантах осуществления; гранулы являются монодисперсными суперпарамагнитными шариками, которые имеют диаметр примерно 4,5 мкм и плотность примерно 1,5 г/см^3. В некоторых вариантах осуществления, гранулами являются гранулы монодисперсных суперпарамагнитных гранул, которые имеют средний диаметр примерно 2,8 мкм и плотность примерно 1,3 г/см^3.

В некоторых вариантах осуществления, популяцию обогащенных Т-клеток инкубируют со стимулирующим реагентом в отношении гранул к клеткам точно или примерно 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, отношение гранул к клеткам составляет от 2,5:1 до 0,2:1, от 2:1 до 0,5:1, от 1,5:1 до 0,75:1, от 1,25:1 до 0,8:1, от 1,1:1 до 0,9:1. В конкретных вариантах осуществления, отношение гранул к клеткам составляет примерно 1:1 или составляет 1:1.

b. *Олигомерный реагент мутеин стрептавидина*

В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент содержит олигомерный реагент, например, реагент мутеин стрептавидина, который конъюгирован, связан или присоединен к одному или более агентам, например, лиганду, который способен к активированию внутриклеточного сигнального домена TCR комплекса. В некоторых вариантах осуществления, один или более агентов имеют присоединенный связывающий домен или партнер связывания (например, партнер связывания C), который способен связываться с олигомерным реагентом на конкретных сайтах связывания (например, сайте связывания Z). В некоторых вариантах осуществления, множество агентов обратимо связываются с олигомерным реагентом. В разных вариантах осуществления, олигомерный реагент имеет множество конкретных сайтов связывания, которые, в некоторых вариантах осуществления, обратимо связаны с множеством агентов на связывающем домене (например, партнере связывания C). В некоторых вариантах осуществления, количество связывающих агентов снижается или уменьшается в присутствии конкурирующего реагента, например, реагента, который также способен связываться с конкретными сайтами связывания (например, сайтом связывания Z).

В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент является или включает обратимую систему, в которой, по меньшей мере, один агент (например, агент, который способен продуцировать сигнал в клетке, такой как Т-клетке) ассоциирован, например, обратимо ассоциирован, с олигомерным реагентом. Не ограничивающие примеры олигомерных стимулирующих реагентов могут быть найдены, например, в опубликованной международной заявке PCT № WO 2018/197949, содержание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления, реагент содержит множество сайтов связывания, способных связываться, например, обратимо связываться, с агентом. В некоторых случаях, реагентом является реагент из олигомерных частиц, имеющий, по меньшей мере, один присоединенный агент, способный продуцировать сигнал в клетке, такой как Т-клетка. В некоторых вариантах осуществления, агент содержит, по меньшей мере, один сайт связывания, например, сайт связывания B, который может специфически связывать эпитоп или область молекулы, и также содержит партнер связывания, также названный настоящем документе как партнер связывания C, который специфически связывается с, по меньшей мере, одним сайтом связывания реагента, например, сайтом связывания Z реагента. В некоторых вариантах осуществления, связывающее взаимодействие между партнером связывания C и, по меньшей мере, одним сайтом связывания Z, является не ковалентным взаимодействием. В некоторых случаях, связывающее взаимодействие между партнером связывания C и, по меньшей мере, одним сайтом связывания Z, является ковалентным взаимодействием. В некоторых вариантах осуществления, связывающее взаимодействие, такое как не ковалентное взаимодействие, между партнером связывания C и, по меньшей мере, одним сайтом связывания Z, является обратимым.

Вещества, которые могут применяться в качестве олигомерных реагентов в таких обратимых системах, известны, см., *например*, патенты США №№ 5,168,049; 5,506,121;

6,103,493; 7,776,562; 7,981,632; 8,298,782; 8,735,540; 9,023,604; и опубликованных международных заявках PCT №№ WO2013/124474 и WO2014/076277. Неограничивающие примеры реагентов и партнеров связывания, способных образовывать обратимое взаимодействие, а также веществ (например, конкурирующих реагентов), способных обращать такие связывание, описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления, олигомерным реагентом является олигомер стрептавидина, мутеина стрептавидина или аналог, авидин, мутеин авидина или аналог (такой как нейтравидин) или их смесь, в которой такой олигомерный реагент содержит один или более сайтов связывания для обратимой ассоциации со связывающим доменом агента (например, партнером связывания C). В некоторых вариантах осуществления, связывающим доменом агента может быть биотин, производное биотина или аналог, или стрептавидин-связывающий пептид или другая молекула, которая способна специфически связываться со стрептавидином, мутеином стрептавидина ли аналогом, авидином или авидином мутеина или аналогом.

В некоторых вариантах осуществления, один или более агентов (например, агентов, которые способны продуцировать сигнал в клетке, такой как Т-клетка), ассоциируют с, например, обратимо связываться с, олигомерным реагентом, например, через множество конкретных сайтов связывания (например, сайтами связывания Z) присутствующих на олигомерном реагенте. В некоторых случаях, результатом являются агенты, близко расположенных друг к другу, так, что может возникнуть эффект авидности, если клетки-мишени, имеющие (по меньшей мере, две копии) молекулу клеточной поверхности, которая связывается или распознается агентом, контактируют с агентом.

В некоторых вариантах осуществления, олигомерным реагентом является олигомер стрептавидина, олигомер мутеина стрептавидина, олигомер аналога стрептавидина, олигомер авидина, олигомер, состоящий из мутеина авидина или аналога авидина (такого как нейтравидин) или их смесями. В конкретных вариантах осуществления, олигомерные реагенты содержат конкретные сайты связывания, которые способны связываться со связывающим доменом (например, партнером связывания C) агента. В некоторых вариантах осуществления, связывающим доменом может быть биотин, производное биотина или аналог или стрептавидин-связывающий пептид или другая молекула, которая способна специфически связываться со стрептавидином, мутеином стрептавидина или аналогом, авидином или мутеином авидина или аналогом. Способы, представленные в настоящем документе, дополнительно рассматривают то, что олигомерный реагент может содержать молекулу, способную связываться с олигогистидиновой аффинной меткой, глутатион-S-трансферазой, кальмодулином или его аналогом, кальмодулин-связывающим пептидом (CBP), FLAG-пептидом, HA-меткой, мальтоза-связывающим белком (MBP), HSV эпитопом, myc эпитопом и/или биотинилированным белком-носителем.

В некоторых вариантах осуществления, стрептавидином может быть стрептавидин дикого типа, мутеины стрептавидина или аналоги, такие как стрептавидин-подобные

полипептиды. Также, авидин, в некоторых аспектах, включает авидин дикого типа или мутеины или аналоги авидина, такие как нейтравидин, дегликозилированный авидин с модифицированными аргининами, которые обычно демонстрируют более нейтральный pi и доступны в качестве альтернативы нативному авидину. Обычно, дегликозилированные нейтральные формы авидина включают коммерчески доступные формы, такие как «Экстравидин», доступный от Aldrich, или «НейтрАвидин», доступный от Thermo Scientific или Invitrogen, например.

В некоторых вариантах осуществления, реагентом является стрептавидин или мутеин стрептавидина или аналог. В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин дикого типа (дт-стрептавидин) имеет аминокислотную последовательность, описанную у Argarana et al, Nucleic Acids Res. 14 (1986) 1871-1882 (SEQ ID NO: 66). В общем, стрептавидин в природе существует как тетрамер из четырех идентичных субъединиц, т.е. является гомо-тетрамером, где каждая субъединица содержит один сайт связывания для биотина, производного биотина или аналога или миметика биотина. Типовой последовательностью субъединицы стрептавидина является последовательность аминокислот, указанная в SEQ ID NO: 66, но такая последовательность также может включать последовательность, представленную в его гомологах от других видов Streptomyces. В частности, каждая субъединица стрептавидина может демонстрировать сильную аффинность связывания для биотина с равновесной константой диссоциации (K_D) порядка примерно 10^{-14} М. В некоторых случаях, стрептавидин может существовать в виде одновалентного тетрамера, в котором только один из четырех сайтов связывания является функциональным (Howarth et al. (2006) Nat. Methods, 3:267-73; Zhang et al. (2015) Biochem. Biophys. Res. Commun., 463:1059-63)), двухвалентным тетрамером, в котором два из четырех сайтов связывания являются функциональными (Fairhead et al. (2013) J. Mol. Biol., 426:199-214) или может присутствовать в мономерной или димерной форме (Wu et al. (2005) J. Biol. Chem., 280:23225-31; Lim et al. (2010) Biochemistry, 50:8682-91).

В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин может быть в любой форме, такой как дикий тип или немодифицированный стрептавидин, такой как стрептавидин из видов Streptomyces, или его функционально активный фрагмент, который включает, по меньшей мере, одну функциональную субъединицу, содержащую сайт связывания для биотина, производного биотина или аналога или миметика биотина, например, в общем содержит, по меньшей мере, одну функциональную субъединицу дикого типа стрептавидина из Streptomyces avidinii, указанную в SEQ ID NO: 66, или его функционально активный фрагмент. Например, в некоторых вариантах осуществления, стрептавидин может включать фрагмент дикого типа стрептавидин, который укорочен на N- и/или С-конце. Такие минимальные стрептавидины включают любые, которые начинаются на N-конце в области аминокислотных положений 10-16 из SEQ ID NO: 66 и оканчиваются на С-конце в области аминокислотных положений 133-142 из SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления, функционально активный фрагмент стрептавидина содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 67. В

некоторых вариантах осуществления, стрептавидин, такой как указан в SEQ ID NO: 67, может дополнительно содержать N-концевой метионин в положении, соответствующем Ala13 с нумерацией, указанной в SEQ ID NO: 66. Ссылка на положение остатков в стрептавидине или мутеинах стрептавидина является ссылкой на нумерацию остатков в SEQ ID NO: 66.

Примеры стрептавидинов или мутеинов стрептавидина упомянуты, например, в WO 86/02077, DE 19641876 Al, US 6,022,951, WO 98/40396 или WO 96/24606. Примеры мутеинов стрептавидина известны, см., например, патенты США №№ 5,168,049; 5,506,121; 6,022,951; 6,156,493; 6,165,750; 6,103,493; или 6,368,813; или Опубликованной международной заявке PCT № WO2014/076277.

В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина может содержать аминокислоты, которые не являются частью немодифицированного или дикого типа стрептавидина, или может включать только часть дикого типа или немодифицированного стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит, по меньшей мере, одну субъединицу, которая может иметь одну или более аминокислотных замен (замещений) по сравнению с субъединицей немодифицированного или дикого типа стрептавидина, например, по сравнению с субъединицей дикого типа стрептавидина, указанной в SEQ ID NO: 66 или ее функционально активным фрагментом, например, указанным в SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления, равновесная константа диссоциации (K_D) стрептавидина или мутеина стрептавидина для связывающего домена составляет менее чем 1×10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 5x 10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M или 1×10^{-7} M, но обычно более чем 1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M или 1×10^{-11} M. Например, пептидные последовательности (Strep-tag), такие как описаны в патенте США № 5,506,121, могут действовать как миметики биотина и демонстрировать аффинность связывания для стрептавидина, например, с K_D приблизительно от 10^{-4} до 10^{-5} M. В некоторых случаях, аффинность связывания может быть далее улучшена осуществлением мутации в пределах молекулы стрептавидина, см., например патент США № 6,103,493 или опубликованную международную заявку PCT № WO2014/076277. В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания может быть определена известными способами, такими как описаны в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, реагент, такой как стрептавидин или мутеин стрептавидина, демонстрирует аффинность связывания для пептидного лиганда партнера связывания, где пептидный лиганд партнер связывания может быть партнером связывания C, присутствующим в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или агенте селектирования). В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность содержит последовательность с общей формулой His-Pro-Xaa, где Xaa является глутамином, аспарагином или метионином, таким, как содержится в последовательности, указанной в SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность имеет общую формулу, указанную в SEQ ID NO: 83,

например, указанную в SEQ ID NO: 74. В одном примере, пептидная последовательность является Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (также называемая Strep-tag®, указанная в SEQ ID NO: 75). В одном примере, пептидная последовательность является Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (также называемая Strep-tag® II, указанная в SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд содержит последовательное расположение, по меньшей мере, двух стрептавидин-связывающих модулей, где расстояние между двумя модулями составляет, по меньшей мере, 0 и не более чем 50 аминокислот, где одна связывающая молекула имеет 3-8 аминокислот и содержит, по меньшей мере, последовательность His-Pro-Xaa, где Xaa является глутамином, аспарагином или метионином, и где другая связывающая молекула имеет такой же или другой стрептавидиновый пептидный лиганд, такой как указан в SEQ ID NO: 84 (см., например опубликованной международной заявке PCT № WO02/077018; патент США № 7,981,632). В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд содержит последовательность, имеющую формулу, указанную в любой из SEQ ID NO: 76 или 77. В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд имеет последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NOS: 70-73, 78-79. В большинстве случаев, все эти стрептавидин-связывающие пептиды связываются с одним и тем же сайтом связывания, а именно, биотиновым сайтом связывания стрептавидина. Если один или более таких стрептавидин-связывающих пептидов применяют в качестве партнеров связывания C, например C1 и C2, реагент мультимеризации и/или реагент из олигомерных частиц, связанный с одним или более агентами через партнер связывания C, обычно состоит из одного или более мутеинов стрептавидина.

В некоторых вариантах осуществления, мутеином стрептавидина является мутант, как описано в патенте США № 6,103,493. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит, по меньшей мере, одну мутацию в пределах области аминокислотных положений 44-53, на основе аминокислотной последовательности дикого типа стрептавидина, такой, как указана в SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит мутацию на одном или более остатках 44, 45, 46 и/или 47. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит замену Glu в положении 44 дикого типа стрептавидина на гидрофобную алифатическую аминокислоту, например Val, Ala, Ile или Leu, любую аминокислоту в положении 45, алифатическую аминокислоту, такую как гидрофобная алифатическая аминокислота в положении положение 46, и/или замену Val в положении 47 на основную аминокислоту, например Arg или Lys, 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 указаны в типовых мутеинах стрептавидина, содержащих последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 80 или SEQ ID NO: 81 или 82 (также известный как мутант стрептавидина 1, SAM1). В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит остатки

Ile44-Gly45-Ala46-Arg47, такие как указаны в типовых мутеинах стрептавидина, содержащих последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 85, 68 или 73 (также известный как SAM2). В некоторых случаях, такой мутеин стрептавидина описан, например, в патенте США 6,103,493 и коммерчески доступен под торговым наименованием Strep-Tactin®. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидин содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87. В конкретных вариантах осуществления, молекула является тетрамером стрептавидина или мутеином стрептавидина, содержащим последовательность, указанную в любой из SEQ ID NOS:67, 81, 68, 86, 88, 82 или 73, где, будучи тетрамером, является молекулой, которая содержит 20 первичных аминов, включая 1 N-концевой амин и 4 лизина на мономер.

В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина демонстрирует аффинность связывания, характеризующуюся равновесной константой диссоциации (K_D), которая составляет или составляет менее чем $3,7\times10^{-5}$ М для пептидного лиганда (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; также называемого Strep-tag®, указанного в SEQ ID NO: 75) и/или которая составляет или составляет менее чем $7,1\times10^{-5}$ М для пептидного лиганда (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; также называемого Strep-tag® II, указанного в SEQ ID NO: 69) и/или которая составляет или составляет менее чем $7,0\times10^{-5}$ М, $5,0\times10^{-5}$ М, $1,0\times10^{-5}$ М, $5,0\times10^{-6}$ М, $1,0\times10^{-6}$ М, $5,0\times10^{-7}$ М или $1,0\times10^{-7}$ М, но обычно более чем 1×10^{-13} М, 1×10^{-12} М или 1×10^{-11} М для любого из пептидных лигандов, указанных любой из SEQ ID NOS: 69, 76-78, 70-72, 74, 75, 83, 84.

В некоторых вариантах осуществления, полученный мутеин стрептавидина демонстрирует аффинность связывания, характеризуемую равновесной константной ассоциации (K_A), составляющей или составляющей более чем $2,7\times10^{4}$ M^{-1} для пептидного лиганда (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; также называемого Strep-tag®, указанного в SEQ ID NO: 75) и/или которая составляет или составляет более чем $1,4\times10^{4}$ M^{-1} для пептидного лиганда (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; также называемого Strep-tag® II, указанного в SEQ ID NO: 69) и/или которая составляет или составляет более чем $1,43\times10^{4}$ M^{-1}, $1,67\times10^{4}$ M^{-1}, 2×10^{4} M^{-1}, $3,33\times10^{4}$ M^{-1}, 5×10^{4} M^{-1}, 1×10^{5} M^{-1}, $1,11\times10^{5}$ M^{-1}, $1,25\times10^{5}$ M^{-1}, $1,43\times10^{5}$ M^{-1}, $1,67\times10^{5}$ M^{-1}, 2×10^{5} M^{-1}, $3,33\times10^{5}$ M^{-1}, 5×10^{5} M^{-1}, 1×10^{6} M^{-1}, $1,11\times10^{6}$ M^{-1}, $1,25\times10^{6}$ M^{-1}, $1,43\times10^{6}$ M^{-1}, $1,67\times10^{6}$ M^{-1}, 2×10^{6} M^{-1}, $3,33\times10^{6}$ M^{-1}, 5×10^{6} M^{-1}, 1×10^{7} M^{-1}, но обычно менее чем 1×10^{13} M^{-1}, 1×10^{12} M^{-1} или 1×10^{11} M^{-1} для любого из пептидных лигандов, указанных в любой из SEQ ID NOS: 69, 76-78, 70-72, 74, 75, 83, 84.

В конкретных вариантах осуществления, в настоящем документе представлен реагент из олигомерных частиц, который состоит из и/или содержит множество тетрамеров стрептавидина или мутеинов стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, реагент из олигомерных частиц, представленный в настоящем документе, содержит множество сайтов связывания, которые обратимо связывают или способны обратимо связываться с одним или более агентами, например, стимулирующим агентом и/или агентом селектирования. В некоторых вариантах осуществления, олигомерная

частица имеет радиус, например, средний радиус от 70 нм до 125 нм, включительно; молекулярную массу от 1×10^7 г/моль до 1×10^9 г/моль, включительно; и/или от 1000 до 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, включительно. В некоторых вариантах осуществления, реагент из олигомерных частиц связан, например, обратимо связан, с одним или более агентами, такими как агент, который связывается с молекулой, например рецептором, на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления, одним или более агентами являются агенты, описанные в настоящем документе, например, в разделе II.C.3. В некоторых вариантах осуществления, агентом является анти-CD3 и/или анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как антитело или его антигенный фрагмент, который содержит партнер связывания, например, стрептавидин-связывающий пептид, например Strep-tag® II. В конкретных вариантах осуществления, одним или более агентами являются анти-CD3 и/или анти-CD28 Fab, содержащий партнер связывания, например, стрептавидин-связывающий пептид, например Strep-tag® II.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлен реагент из олигомерных частиц, который состоит из и/или содержит множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, реагент из олигомерных частиц, представленный в настоящем документе, содержит множество сайтов связывания, которые обратимо связывают или способны обратимо связываться с одним или более агентами, например, стимулирующим агентом и/или агентом селектирования. В некоторых вариантах осуществления, олигомерная частица имеет радиус, например, средний радиус от 80 нм до 120 на, включительно; молекулярную массу например, среднюю молекулярную массу от $7,5\times10^6$ г/моль и 2×10^8 г/моль, включительно; и/или количество, например, среднее количество от 500 до 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, включительно. В некоторых вариантах осуществления, реагент из олигомерных частиц связан, например, обратимо связан с одним или более агентами, такими как агент, который связан с молекулой, например, рецептором, на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления, одним или более агентами являются агенты, описанные в настоящем документе, например, в разделе II.C.3. В некоторых вариантах осуществления, агентом является анти-CD3 и/или анти-CD28 Fab, такое как Fab, которое содержит партнер связывания, например, стрептавидин-связывающий пептид, например Strep-tag® II. В конкретных вариантах осуществления, одним или более агентами являются анти-CD3 и/или анти-CD28 Fab, содержащие партнер связывания, например, стрептавидин-связывающий пептид, например Strep-tag® II.

В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют в присутствии, примерно или по меньшей мере, 0,01 мкг, 0,02 мкг, 0,03 мкг, 0,04 мкг, 0,05 мкг, 0,1 мкг, 0,2 мкг, 0,3 мкг, 0,4 мкг, 0,5 мкг, 0,75 мкг, 1 мкг, 2 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг, 6 мкг, 7 мкг, 8 мкг, 9 мкг или 10 мкг олигомерного стимулирующего реагента на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют в присутствии или примерно 4 мкг на 10^6

клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 3 мкг на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 2,75 мкг на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 2,5 мкг на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 2,25 мкг на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 2 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 1,8 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 1,6 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 1,4 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 1,2 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 1 мкг на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют в присутствии или примерно 0,8 мкг на 10^6 клеток. В определенных аспектах, 4 мкг олигомерного стимулирующего реагента имеет или включает 3 мкг олигомерных частиц и 1 мкг присоединенных агентов, например, 0,5 мкг анти-CD3 Fab и 0,5 мкг анти-CD28 Fab. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 10×10^8, 9×10^8, 8×10^8, 7x 10^8, 6×10^8, 5×10^8, 4×10^8, 3×10^8, 2×10^8, 1×10^8 олигомерных реагентов. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 7x 10^8, 6×10^8, 5×10^8, 4×10^8, 3×10^8 олигомерных реагентов. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или от примерно 7x 10^8 до 3×10^8 олигомерных реагентов. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или от примерно 6×10^8 до 4×10^8 олигомерных реагентов. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или от примерно 6×10^8 до 5×10^8 олигомерных реагентов. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимулированию в присутствии или примерно 5×10^8 олигомерных реагентов.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, выбранные клетки образца, являются стимулированными или подвергаются стимулированию в присутствии отношения олигомерного реагента к клеткам точно или примерно 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, отношение олигомерного реагента к клеткам составляет от 2,5:1 до 0,2:1, от 2:1 до 0,5:1, от 1,5:1 до 0,75:1, от 1,25:1 до 0,8:1, от 1,1:1 до 0,9:1. В

конкретных вариантах осуществления, отношение олигомерного реагента к клеткам составляет примерно 1:1 или составляет 1:1. В конкретных вариантах осуществления, отношение олигомерного реагента к клеткам составляет примерно 0,3:1 или составляет 0,3:1. В конкретных вариантах осуществления, отношение олигомерного реагента к клеткам составляет примерно 0,2:1 или составляет 0,2:1.

В определенных аспектах, для олигомерного реагента, массовое отношение между олигомерными частицами и присоединенными агентами составляет примерно 3:1. В определенных аспектах, в пределах олигомерного реагента, массовое отношение между олигомерными частицами, присоединенными анти-CD3 Fab и присоединенными анти-CD28 Fab составляет примерно 3:0,5:0,5. В определенных аспектах, 4 мкг олигомерного реагента составляет или включает 3 мкг олигомерных частиц и 1 мкг присоединенных агентов, например, 0,5 мкг анти-CD3 Fab и 0,5 мкг анти-CD28 Fab. В других примерах, 1,2 мкг олигомерного реагента на 10^6 клеток составляет или включает 0,9 мкг олигомерных частиц и 0,3 мкг присоединенных реагентов, например, 0,15 мкг анти-CD3 Fab и 0,15 мкг анти-CD28 Fab, на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный реагент добавляют к бессывороточной среде, и стимулирование проводят в бессывороточной среде, например, как описано в PCT/US2018/064627.

В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит минимальную среду (например OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Media (ThermoFisher), с добавлением одной или более добавок. В некоторых вариантах осуществления, одна или более добавок являются бессывороточными. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит минимальную среду с добавлением одного или более дополнительных компонентов для сохранения, размножения и/или активации клеток (например, Т-клеток), таких, которые предоставляются дополнительными добавками (например, OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (ThermoFisher)). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно добавку для заменяя сыворотки, например, замену сыворотки иммунных клеток, например, ThermoFisher, #A2596101, CTS™ Immune Cell Serum Replacement или замену сыворотки иммунных клеток, описанную у Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит свободную форму аминокислоты, такой как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит дипептидную форму L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина), такую как дипептид в Glutamax™ (ThermoFisher). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит один или более рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный IL-2 человека, рекомбинантный IL-7 человека и/или рекомбинантный IL-15 человека.

2. Удаление стимулирующих реагентов

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют или отделяют из клеток или клеточной популяции до получения, сбора или составления клеток. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие реагенты удаляют или

отделяют от клеток или клеточных популяций после или во время инкубирования, например, инкубирования, описанного в настоящем документе, например, в разделе I.D. В некоторых вариантах осуществления, клетки или клеточная популяция претерпевает процесс, процедуру, стадию или методику удаления стимулирующего реагента после инкубирования, но до стадий получения, сбора или составления клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки или клеточная популяция претерпевает процесс, процедуру, стадию или методику удаления стимулирующего реагента после инкубирования. В некоторых аспектах, если стимулирующий реагент отделяют или удаляют из клеток во время инкубирования, клетки возвращают в те же условия инкубирования, как до отделения или удаления на все оставшееся время инкубирования.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток. Не желая быть связанными теорией, конкретные варианты осуществления предполагают, что связывание и/или ассоциация между стимулирующим реагентом и клетками, в некоторых обстоятельствах, может быть снижена с течением времени во время инкубирования. В некоторых вариантах осуществления, один или более агентов могут быть добавлены для снижения связывания или ассоциации между стимулирующим реагентом и клетками. В конкретных вариантах осуществления, изменение условий культивирования клеток, например, добавление агента может снизить связывание и/или ассоциацию между стимулирующим реагентом и клетками. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент может быть удален из инкубирования, системы культивирования клеток и/или раствора отдельно от клеток, например, также без удаления клеток из инкубирования, системы культивирования клеток и/или раствора.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент отделяют и/или удаляют из клеток через некоторое количество времени. В конкретных вариантах осуществления, количеством времени является количество времени от начала стимулирования. В конкретных вариантах осуществления, началом инкубирования считается точно или примерно временем, в течение которого клетки контактируют со стимулирующим реагентом и/или средой, содержащей стимулирующий реагент. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток в пределах или в пределах примерно 120 часов, 108 часов, 96 часов, 84 часов, 72 часов, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов или 12 часов, включительно, от начала стимулирования. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток точно или примерно через 48 часов после начала стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток точно или примерно через 72 часов после начала стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток точно или примерно через 96 часов после начала стимулирования.

a. Удаление гранулированных реагентов

В некоторых вариантах осуществления, гранулированный стимулирующий реагент, например, конъюгированные с анти-CD3/анти-CD28 антителом парамагнитные гранулы, отделяют или удаляют из клеток или клеточной популяции. Способы удаления стимулирующих реагентов (например стимулирующих реагентов, которые являются или содержат частицы, такие как гранулированные частицы или намагничиваемые частицы) из клеток известны. В некоторых вариантах осуществления, может осуществляться применение конкурирующих антител, таких как не меченые антитела, которые, например, связываются с первичным антителом стимулирующего реагента и изменяют его аффинность для его антигена на клетке, тем самым позволяя осторожное отсоединение. В некоторых случаях, после отсоединения, конкурирующие антитела могут оставаться ассоциированными с частицей (например, гранулированной частицей), при этом непрореагировавшее антитело является или может быть вымыто и клетки освобождены от выделения, селектирования, обогащения и/или активирования антителом. Таким типовым реагентом является DETACaBEAD (Friedl et al. 1995; Entschladen et al. 1997). В некоторых вариантах осуществления, частицы (например, гранулированные частицы) могут быть удалены в присутствии расщепляемого линкера (например, ДНК линкера), в то время как связанные с частицами антитела конъюгированы с линкером (например, CELLection, Dynal). В некоторых случаях, линкерная область представляет сайт отщепления для удаления частиц (например, гранулированных частиц) из клеток после выделения, например, добавлением ДНазы или другого освобождающего буфера. В некоторых вариантах осуществления, другие ферментные способы могут применяться для выделения частиц (например, гранулированных частиц) из клеток. В некоторых вариантах осуществления, частицы (например, гранулированные частицы или намагничиваемые частицы) являются биоразлагаемыми.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент является магнитным, парамагнитным и/или суперпарамагнитным, и/или содержит гранулы, которые являются магнитными, парамагнитными или суперпарамагнитными, и стимулирующий реагент может быть удален из клеток через обработку клеток магнитным полем. Примеры подходящего оборудования, содержащего магниты для создания магнитного поля, включают DynaMag CTS (Thermo Fisher), Magnetic Separator (Takara) и EasySep Magnet (Stem Cell Technologies).

В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток до завершения представленных способов, например, до сбора, получения и/или составления сконструированных клеток, полученных способами, представленными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток после конструирования, например, трансдуцирования или трансфицирования, клеток.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий гранулированный реагент, например, стимулирующий магнитный гранулированный реагент, удаляют или отделяют от клеток или клеточной популяции до получения, сбора или составления

клеток. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий гранулированный реагент, например, стимулирующий магнитный гранулированный реагент, удаляют или отделяют от клеток или клеточных популяций через обработку магнитным полем во время или после инкубирования, например, инкубирования, описанного в настоящем документе, например, в разделе I-D. В некоторых вариантах осуществления, клетки или клеточные популяции подвергают магнитному полю для удаления стимулирующего гранулированного реагента, например, стимулирующего магнитного гранулированного реагента, после инкубирования, но до стадий получения, сбора или составления клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки или клеточную популяцию подвергают магнитному полю для удаления стимулирующего гранулированного реагента, например, стимулирующего магнитного гранулированного реагента, после инкубирования. В некоторых аспектах, когда стимулирующий гранулированный реагент отделяют или удаляют от клеток или клеточной популяции во время инкубирования, клетки или клеточную популяцию возвращают в те же условия инкубирования, что и до обработки магнитным полем в течение всего оставшегося срока инкубирования.

В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий гранулированный реагент, например, стимулирующий магнитный гранулированный реагент, удаляют или отделяют от клеток, например, через обработку магнитным полем, в пределах или в пределах примерно 120 часов, 108 часов, 96 часов, 84 часов, 72 часов, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов или 12 часов, включительно, инкубирования. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий гранулированный реагент, например, стимулирующий магнитный гранулированный реагент, удаляют или отделяют от клеток, например, обработкой магнитным полем, после или после примерно 72 часов инкубирования. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий гранулированный реагент, например, стимулирующий магнитный гранулированный реагент, удаляют или отделяют клеток, например, обработкой магнитным полем, после или после примерно 96 часов инкубирования.

b. *Удаление олигомерных реагентов*

В некоторых вариантах осуществления, популяцию инкубированных Т-клеток получают или генерируют в соответствии с любым из способов, представленных в настоящем документе, в которых вещество, такое как конкурирующий агент, добавляют к Т-клеткам для прерывания, такого как снижение и/или превращение, подачи сигнала стимулирующего агента или агентов. В некоторых вариантах осуществления, популяция инкубированных Т-клеток включает присутствие вещества, такого как конкурирующий агент, например биотин или аналог биотина, например D-Биотин. В некоторых вариантах осуществления, вещество, такое как конкурирующий агент, например биотин или аналог биотина, например D-Биотин, присутствует в количестве, составляющем, по меньшей мере, 1,5-кратно больше, по меньшей мере, 2-кратно, по меньшей мере, 3-кратно, по меньшей мере, 4-кратно, по меньшей мере, 5-кратно, по меньшей мере, 10-кратно, по меньшей мере, 100-кратно, по меньшей мере, 1000-кратно или более чем количество

вещества в эталонной популяции или препарате культивированных Т-клеток, в которые вещество не было добавлено экзогенно во время инкубирования. В некоторых вариантах осуществления, количество вещества, такого как конкурирующий агент, например биотин или аналог биотина, например D-Биотин, в популяции культивированных Т-клеток составляет от или от примерно 10 мкМ до 100 мкМ, 100 мкМ до 1 мМ, 100 мкМ до 500 мкМ или 10 мкМ до 100 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, 10 мкМ или примерно 10 мкМ биотина или аналога биотина, например, D-биотина, добавляют к клеткам или клеточной популяции для отделения или удаления олигомерного стимулирующего реагента от клеток или клеточной популяции.

В некоторых вариантах осуществления, один или более агентов (например, агентов, которые стимулируют или активируют TCR и/или корецептор) ассоциируют с, например, обратимо связываются с, олигомерным реагентом, например, через множество определенных сайтов связывания (например, сайтов связывания Z), присутствующих на олигомерном реагенте. В некоторых случаях, это приводит к тому, что агенты близко расположены друг к другу так что может возникнуть эффект авидности, если клетки-мишени, имеющие (по меньшей мере, две копии) молекулы клеточной поверхности, которые связаны или распознаются агентом, находятся в контакте агентом. В некоторых аспектах, рецептор-связывающий реагент имеет низкую аффинность в отношении рецепторной молекулы клетки на сайте связывания B, так, что рецептор-связывающий реагент диссоциирует из клетки в присутствии конкурирующего реагента. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, агенты удаляют из клеток в присутствии конкурирующего реагента.

В некоторых вариантах осуществления, олигомерным стимулирующим реагентом является олигомер мутеина стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3 и анти-CD28 Fab. В некоторых вариантах осуществления, присоединенные Fab содержат стрептавидин-связывающие домены, например, которые позволяют обратимое присоединение олигомера мутеина стрептавидина. В некоторых случаях, анти-CD3 и анти-CD28 Fab близко расположены друг к другу так, что может возникнуть эффект авидности, если Т-клетки, экспрессирующие CD3 и/или CD28, контактируют с олигомерным стимулирующим реагентом с обратимо присоединенными Fab. В некоторых аспектах, Fab имеют низкую аффинность в отношении CD3 и CD28, так, что Fab диссоциируют из клеток в присутствии конкурирующего реагента, например, биотина или варианта или аналога биотина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, Fab удаляют или диссоциируют из клеток в присутствии конкурирующего реагента, например, D-биотина.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий олигомерный реагент, например, стимулирующий олигомерный реагент мутеина стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток или клеточной популяции до получения, сбора или составления клеток. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий олигомерный реагент, например, стимулирующий олигомерный реагент мутеина стрептавидина, удаляют или

отделяют от клеток или клеточной популяции через контакт или обработку конкурирующим реагентом, например, биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, до или во время инкубирования, например, инкубирования, описанного в настоящем документе, например, в разделе I.D. В некоторых вариантах осуществления, клетки или клеточную популяцию подвергают контакту или обрабатывают конкурирующим реагентом, например, биотином или аналогом биотина, таким как D-биотин, для удаления стимулирующего олигомерного реагента, например, стимулирующего олигомерного реагента мутеина стрептавидина, после инкубирования, но до стадий получения, сбора или составления клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки или клеточную популяцию подвергают контакту или обрабатывают конкурирующим реагентом, например, биотином или аналогом биотина, таким как D-биотин, для удаления стимулирующего олигомерного реагента, например, стимулирующего олигомерного реагента мутеина стрептавидина, после инкубирования. В некоторых аспектах, если стимулирующий олигомерный реагент, например, стимулирующий олигомерный реагент мутеина стрептавидина, отделяют или удаляют от клеток во время инкубирования, например, через контакт или обработку конкурирующим реагентом, например, биотином или аналогом биотина, например D-биотином, клетки возвращают в те же условия инкубирования, что и до отделения или удаления, на весь оставшийся период инкубирования.

В некоторых вариантах осуществления, клетки контактируют с, с примерно или с, по меньшей мере, 0,01 мкМ, 0,05 мкМ, 0,1 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ, 0,01 мкМ, 1 мМ или 10 мМ конкурирующего реагента для удаления или отделения олигомерного стимулирующего реагента от клеток. В разных вариантах осуществления, клетки контактируют с, с примерно или с, по меньшей мере, 0,01 мкМ, 0,05 мкМ, 0. 1 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ, 0,01 мкМ, 1 мМ или 10 мМ биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, для удаления или отделения олигомеров стимулирующего мутеина стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3 и анти-CD28 Fab от клеток.

В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий олигомерный реагент, например, стимулирующий олигомерный реагент мутеина стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток в пределах или в пределах примерно 120 часов, 108 часов, 96 часов, 84 часов, 72 часов, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов или 12 часов, включительно, инкубирования, например, в присутствии стимулирующего олигомерного реагента мутеин стрептавидина. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют или отделяют от клеток после или после примерно 48 часов инкубирования, например, в присутствии стимулирующего олигомерного реагента. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий олигомерный реагент, например, стимулирующий олигомерный реагент мутеина стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток после или после примерно 72 часов инкубирования. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий олигомерный реагент, например, стимулирующий

олигомерный реагент мутеина стрептавидина удаляют или отделяют от клеток через точно или примерно 96 часов инкубирования.

B. Генетическое конструирование

В некоторых вариантах осуществления, переставленные способы включают генетическое конструирование клеток, например, клеток, содержащихся или полученных из популяции обогащенных CD57- Т-клеток, например, введением гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок. Такие рекомбинантные белки могут включать рекомбинантные рецепторы, такие как любые, описанные в настоящем документе, например, в разделе IV. Введение полинуклеотидов, например, гетерологичных или рекомбинантных полинуклеотидов, кодирующих рекомбинантный белок, в клетки может проводиться с применением любого количества известных векторов. Такие векторы включают вирусные, включая лентивирусные или гаммаретровирусные, системы. Типовые способы включают такие, которые предназначены для переноса гетерологичных полинуклеотидов, кодирующих рецепторы, включая вирусную, например, ретровирусную или лентивирусную, трансдукцию. В некоторых вариантах осуществления, популяция стимулированных клеток генетически сконструирована, например, для введения гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, тем самым создавая популяцию трансформированных клеток (также названную в настоящем документе трансформированная популяция клеток).

В конкретных вариантах осуществления, клетками являются генетически сконструированными, трансформированными или трансдуцированными после стимулирования, активации и/или инкубирования клеток в условиях стимулирования, например, любыми способами из настоящего документа, представленными, например, в разделе III.A. В конкретных вариантах осуществления, одна или более стимулированных популяций были ранее истощены или отделены от CD57+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, способы генетического конструирования проводят через контакт или введение одной или более клеток из популяции с полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотид является гетерологичным к клеткам. В конкретных вариантах осуществления, гетерологичный полинуклеотид не является нативным к клеткам. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный полинуклеотид не является нативным к любому вектору, например, вирусному вектору, из которое он получен. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный полинуклеотид кодирует белок, например, рекомбинантный белок, который не является нативно экспрессированным клеткой. В конкретных вариантах осуществления, гетерологичный нуклеиновый полинуклеотид является или содержит последовательность нуклеиновых кислот, которая не найдена в клетке до введения.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, стимулированные

клетки, являются сконструированными, например, трансдуцированными или в присутствии адъюванта трансдукции. Типовые адъюванты трансдукции включают, но не ограничены ими, поликатионы, фибронектин или полученные из фибронектина фрагменты или варианты и RetroNectin. В некоторых вариантах осуществления, клетки сконструированы в присутствии поликатионов, фибронектина или полученных из фибронектина фрагментов или вариантов, и/или RetroNectin. В конкретных вариантах осуществления, клетки сконструированы в присутствии поликатиона, которым является полибрен, DEAE-декстран, сульфат протамина, поли-L-лизин или катионная липосома. В конкретных вариантах осуществления, клетки сконструированы в присутствии сульфата протамина.

В некоторых вариантах осуществления, генетическое конструирование, например, трансдукцию, проводят в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточной средой является характеризованная или хорошо характеризованная среда для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточной средой является контролируемая культуральная среда, которая была обработана, например, отфильтрована для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит белки. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда может содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы присоединения.

В конкретных вариантах осуществления, клетки сконструированы в присутствии одного или более цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, одним или более цитокинами являются рекомбинантные цитокины. В конкретных вариантах осуществления, одним или более цитокинами являются рекомбинантные цитокины. В некоторых вариантах осуществления, один или более цитокинов связываются с и/или способны связываться с рецепторами, которые экспрессированы и/или являются эндогенными к Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов являются или включают член 4-альфа-спираль-связанного семейства цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, члены 4-альфа-спираль-связанного семейства цитокинов включают, но не ограничены ими, 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 более цитокинов являются или включают IL-15. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов являются или включают IL-7. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов являются или включают рекомбинантный IL-2.

В некоторых вариантах осуществления, клетки генетически сконструированы, трансформированы или трансдуцированы в присутствии той же или похожей среды, которая присутствует во время стимулирования. В некоторых вариантах осуществления,

клетки генетически сконструированы, трансформированы или трансдуцированы в среде, имеющей те же цитокины, что и среда, присутствующая во время стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки генетически сконструированы, трансформированы или трансдуцированы, в среде, имеющей те же цитокины в тех же концентрациях, что и среда, присутствующая во время стимулирования.

В некоторых вариантах осуществления, клетки генетически сконструированы, трансформированы или трансдуцированы в присутствии той же или подобной среды, которая присутствует во время стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки генетически сконструированы, трансформированы или трансдуцированы в среде, имеющей те же цитокины, что и среда, присутствующая во время стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки генетически сконструированы, трансформированы или трансдуцированы, в среде, имеющей те же цитокины в тех же концентрациях, что и среда, присутствующая во время стимулирования.

1. Трансдукция

В некоторых вариантах осуществления, генетическое конструирование клеток является или включает полинуклеотида, например, гетерологичного полинуклеотида, в клетки трансдукцией. В некоторых вариантах осуществления, клетки трансдуцированы вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления, вирусом является ретровирусный вектор, такой как гаммаретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Способы лентивирусной трансдукции известны. Типовые способы описаны в, например, Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeyen et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; и Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505.

В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию проводят через контакт одной или более клеток популяции с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, контакт может проводиться центрифугированием, таким как центрифужная инокуляция (например, центрифужная инокуляция). Такие способы включают любые способы, описанные в международной публикации номер WO2016/073602. Типовые центрифужные камеры включают такие, которые производятся и продаются Biosafe SA, включая те, которые применяются с системой Sepax® и Sepax® 2, включая A-200/F и A-200 центрифужные камеры и разные наборы для применения с такими системами. Типовые камеры и инструменты для обработки описаны, например, в патенте США № 6,123,655, патенте США № 6,733,433 и опубликованной заявке на патент США, публикация №: US 2008/0171951 и опубликованной международной заявке на патент № WO 00/38762, содержание каждой из которых включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей полноте. Типовые наборы для применения с такими системами включают, но не ограничены ими, одноразовые наборы, продаваемые BioSafe SA под торговым наименованием CS-430,1, CS-490,1, CS-600,1 или CS-900,2.

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы применяют в

связи с трансдуцированием вирусного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор в, в примерно или в менее чем 300×10^6 клеток, например, жизнеспособных Т-клеток стимулированной клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, точно или примерно 100×10^6 клеток, например, жизнеспособных Т-клеток стимулированной клеточной популяции трансдуцированы.

В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию проводят в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию проводят в присутствии IL-2, IL-7 и IL-15. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, клетки стимулированной клеточной популяции содержат, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90% или по меньшей мере, 95% клеток, которые являются CD4+ Т-клетками или CD8+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию проводят в течение от 24 до 48 часов, от 36 до 12 часов, от 18 до 30 часов или в течение от примерно 24 часов. В некоторых вариантах осуществления, стадию трансдукции начинают в течение двух дней, в течение 36 часов или в течение 30 часов от начала инициации инкубирования, например, инкубирования в условиях стимулирования.

В некоторых вариантах осуществления, система включена и/или помещена в сочетании с другими инструментами, включая инструменты для работы, автоматизации, контроля и/или отслеживания аспектов стадии трансдукции и одной или более разных других стадий обработки, проводимых в системе, например, одной или более стадий обработки, которые могут проводиться с или в сочетании с системой центрифужной камеры, как описано в настоящем документе или в международной публикации номер WO2016/073602. Эти инструменты в некоторых вариантах осуществления находятся в пределах камеры. В некоторых вариантах осуществления, инструменты включают камеру, которая включает кожух, содержащий контрольную схему, центрифугу, крышку, моторы, насосы, датчики, дисплеи и пользовательский интерфейс. Типовое устройство описано в патенте США № 6,123,655, патенте США № 6,733,433 и US 2008/0171951.

В некоторых вариантах осуществления, система содержит ряд контейнеров, например, пакетов, трубок, кранов, зажимов, соединителей и центрифужных камер. В некоторых вариантах осуществления, контейнеры, такие как пакеты, включают, один или более контейнеров, таких как пакеты, содержащих трансдуцируемые клетки и частицы вирусного вектора, в одном и том же контейнере или разных контейнерах, таких как один и тот же пакет или отдельные пакеты. В некоторых вариантах осуществления, система дополнительно включает один или более контейнеров, таких как пакеты, содержащих среду, такую как разбавитель и/или промывочный раствор, который запускают в камеру и/или другие компоненты для разбавления, ресуспендирования и/или промывания компонентов и/или популяций во время способов. Контейнеры могут быть соединены в одном или более положениях в системе, например, в положении, соответствующем входной линии, линии разбавителя, линии промывания, линии отходов и/или выходной линии.

В некоторых вариантах осуществления, камера связана с центрифугой, которая

способна осуществлять ротацию камеры, например, вокруг ее оси вращения. Вращение может происходить до, во время и/или после инкубирования в сочетании с трансдукцией клеток и/или на одной или более других стадиях обработки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, одну или более разных стадий обработки проводят при вращении, например, с определенной силой. Камера обычно способна к вертикальному или в общем вертикальному вращению, так, чтобы камера находилась вертикально во время центрифугирования и боковые стенки и ось расположены вертикально или в основанном вертикально, и торцевая стенка расположена горизонтально или в основном горизонтально.

В некоторых вариантах осуществления, популяция, содержащая клетки, и популяция, содержащая частицы вирусного вектора и, необязательно, воздух, могут быть объединены или смешаны с до подачи популяции в полость. В некоторых вариантах осуществления, популяция, содержащая клетки, и популяция, содержащая частицы вирусного вектора и, необязательно, воздух, могут быть объединены или смешаны в полости. В некоторых вариантах осуществления, популяция, содержащая клетки, и популяция, содержащая частицы вирусного вектора и, необязательно, воздух, могут быть поданы во внутреннюю полость в любом порядке. В любых из таких вариантов осуществления, популяция, содержащая клетки и вирусные частицы, является входной композицией, объединенной или смешанной вместе, независимо от того, происходит ли такое смешивание внутри или вне центрифужной камеры и/или от того, представлены ли клетки и частицы вирусного вектора в центрифужной камере вместе или отдельно, например, одновременно или последовательно.

В некоторых вариантах осуществления, поглощение объема газа, такого как воздух, происходит до инкубирования клеток и частиц вирусного вектора, например, вращением, в способе трансдукции. В некоторых вариантах осуществления, поступление объема газа, такого как воздух, происходит во время инкубирования клеток и частиц вирусного вектора, например, вращением, в способе трансдукции.

В некоторых вариантах осуществления, жидкий объем клеток или частиц вирусного вектора, которые составляют трансдукцию популяции и, необязательно, объем воздуха, может быть заранее определенным объемом. Объемом может быть объем, который запрограммирован в и/или контролируется схемой, ассоциированной с системой.

В некоторых вариантах осуществления, поступление трансдуцируемой популяции и необязательно газа, такого как воздух, контролируют вручную, полуавтоматически и/или автоматически до запуска желаемого или заранее определенного объема во внутреннюю полость камеры. В некоторых вариантах осуществления, датчик, связанный с системой, может определить поток жидкости и/или газа, в и из центрифужной камеры, например, по его цвету, скорости потока и/или плотности, и может коммуницировать со связанной схемой для остановки или продолжения поступления, при необходимости, до достижения поступления такого желаемого или заранее определенного объема. В некоторых аспектах, датчик, который запрограммирован или способен только определять

жидкость в системе, но не газ (например, воздух), могут быть сделаны способными пропускать газ, например воздух, в систему без остановки поступления. В некоторых таких вариантах осуществления, непрозрачный кусок трубки может быть помещен в линию рядом с датчиком, когда желателен впуск газа, такого как воздух. В некоторых вариантах осуществления поступление газа, например воздуха, можно контролировать вручную.

В аспектах представленных способов, внутреннюю полость центрифужной камеры подвергают высокоскоростному вращению. В некоторых вариантах осуществления, вращение проводят до, одновременно, последовательно или по очереди с поступлением жидкой входной композиции и, необязательно, воздуха. В некоторых вариантах осуществления, вращение производят после поступления жидкой входной композиции и, необязательно, воздуха. В некоторых вариантах осуществления, вращение производят центрифугированием центрифужной камеры при относительной центробежной силе на внутренней поверхности боковой стенки внутренней полости и/или на поверхностном слое клеток точно или примерно или, по меньшей мере, точно или примерно 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 центрифугированием производят с силой, равно более чем или примерно 1100 g, например, более чем или примерно 1200 g, более чем или примерно 1400 g, более чем или примерно 1600 g, более чем или примерно 1800 g, более чем или примерно 2000 g, более чем или примерно 2400 g, более чем или примерно 2800 g, более чем или примерно 3000 g или более чем или примерно 3200 g. В конкретных вариантах осуществления, вращение центрифугированием производят с силой от 600 g и 800 g. В конкретных вариантах осуществления, вращение центрифугированием происходят с силой, равной или равной примерно 693 g. В некоторых вариантах осуществления, вращение центрифугированием происходят с силой, которая равна или равна примерно 1600g.

В некоторых вариантах осуществления газ, такой как воздух, в полости камеры вытесняется из камеры. В некоторых вариантах осуществления газ, например воздух, вытесняется в контейнер, который функционально связан как часть закрытой системы с центрифужной камерой. В некоторых вариантах осуществления, контейнер представляет собой свободный или пустой контейнер. В некоторых вариантах осуществления, воздух, такой как газ, в полости камеры вытесняется через фильтр, который функционально соединен с внутренней полостью камеры через стерильную трубку. В некоторых вариантах осуществления, воздух удаляется с использованием ручных, полуавтоматических или автоматических процессов. В некоторых вариантах осуществления воздух удаляется из камеры до, одновременно, периодически или последовательно с отжимом выходной популяции, содержащей инкубированные клетки и частицы вирусного вектора, такие как клетки, в которых трансдукция была инициирована, или клетки были трансдуцированы с помощью вирусного вектора, из полости камеры.

В некоторых вариантах осуществления трансдукцию и/или другое инкубирование

проводят как или как часть непрерывного или полунепрерывного процесса. В некоторых вариантах осуществления, непрерывный процесс включает непрерывное поступление клеток и частиц вирусного вектора, например, трансдуцируемой композиции (либо в виде одной уже существующей композиции, либо путем непрерывного впуска в один и тот же сосуд, например, полость, и, тем самым, смешивая ее части), и/или непрерывный отжим или вытеснение жидкости и, необязательно, вытеснение газа (например воздуха) из сосуда, во время, по меньшей мере, части инкубирования, например, при центрифугировании. В некоторых вариантах осуществления, непрерывное поступление и непрерывный отжим проводят, по меньшей мере, частично, одновременно. В некоторых вариантах осуществления, непрерывное поступление происходит во время части инкубирования, например, во время части центрифугирования, и непрерывный отжим происходит во время отдельной части инкубирования. Это может чередоваться. Таким образом, непрерывное поступление и отжим, при проведении инкубирования, могут позволить обработать больший общий объем образца, например, трансдуцировать.

В некоторых вариантах осуществления, инкубирование является частью непрерывного процесса, где способ включает, по меньшей мере, во время части инкубирования, непрерывное поступление указанной трансдуцируемой композиции в полость во время вращения камеры, и в течение части инкубирования, непрерывный отжим жидкости и, необязательно, вытеснение газа (например, воздуха) из полости через, по меньшей мере, одно отверстие во время вращения камеры.

В некоторых вариантах осуществления, полунепрерывное инкубирование проводят путем чередования между поступлением композиции в полость, инкубированием, отжимом жидкости из полости и необязательным удалением газа (например, воздуха) из полости, например, в выходной контейнер, и затем поступлением следующей (например, второй, третьей и т. д.) композиции, содержащей больше клеток, и других реагентов для обработки, например частиц вирусного вектора, и повторение процесса. Например, в некоторых вариантах осуществления, инкубирование является частью полунепрерывного процесса, где способ включает, до инкубирования, осуществление поступления трансдуцируемой композиции в полость через указанное, по меньшей мере, одно отверстие, и после инкубирования, проведение отжима жидкости из полости; осуществление поступления другой трансдуцируемой композиции, содержащей клетки, и частиц вирусного вектора в указанную внутреннюю полость; и инкубирование другой трансдуцируемой композиции в указанной внутренней полости в условиях, при которых указанные клетки в указанной другой трансдуцируемой композиции трансдуцированы указанным вектором. Процесс может быть продолжен итеративно для ряда дополнительных раундов. В этом отношении, полунепрерывные или непрерывные способы могут позволить производство даже большего объема и/или количества клеток.

В некоторых вариантах осуществления, часть трансдукции инкубированием проводят в центрифужной камере, и проводят в условиях, включающих вращение или центрифугирование.

В конкретных вариантах осуществления, трансдукция клеток вирусным вектором является или включает центрифужную инокуляцию, например, центрифугирование смеси, содержащей клетки и вирусные частицы. В некоторых вариантах осуществления, композиция, содержащая клетки и вирусные частицы, может быть повергнута вращению в основном при относительно низкой силе или скорости, например, при скорости ниже чем та, которая применяется для осаждения клеток центрифугированием, например, от или от примерно 600 об./мин. до 1700 об./мин. (например точно или примерно 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 силой, например, относительной центробежной силой, от или от примерно 100 g до 4000 g (например, точно или примерно, или, по меньшей мере, точно или примерно 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), измеренной, например, на внутренней или внешней стенке камеры или полости.

В некоторых вариантах осуществления, клетки инокулируют центрифугированием с вирусным вектором с силой, например, относительной центрифужной силой, составляющей от или от примерно 100 g и 4000 g, 200 g и 1,000 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 некоторых вариантах осуществления, клетки инокулируют центрифугированием с частицами вирусного вектора с силой, с силой, по меньшей мере, или с силой примерно 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 600 g, 700 g, 800 g, 900 g, 1000 g, 1200g, 1500 g, 1600g, 2000 g, 2500 g, 3000 g, 3200 g или 3500 g. В некоторых вариантах осуществления, клетки трансдуцированы с вирусным вектором с силой, составляющей или составляющей примерно 692 g. В конкретных вариантах осуществления, клетки трансдуцированы с вирусным вектором с силой, составляющей или составляющей примерно 1600 g. В некоторых вариантах осуществления, силой является сила на внутренней поверхности боковой стенки внутренней полости и/или на поверхностном слое клеток.

В некоторых вариантах осуществления, клетки инокулируют центрифугированием, например, клеточную композицию, содержащую клетки и вирусный вектор, вращают в течение более чем или примерно 5 минут, например, более чем или примерно 10 минут, более чем или примерно 15 минут, более чем или примерно 20 минут, более чем или примерно 30 минут, более чем или примерно 45 минут, более чем или примерно 60 минут, более чем или примерно 90 минут или более чем или примерно 120 минут; или от или от примерно 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, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, клетки инокулируют центрифугированием с вирусным вектором в течение примерно 30 минут. В некоторых вариантах осуществления, клетки инокулируют центрифугированием с вирусным вектором в течение примерно 60 минут.

В некоторых вариантах осуществления, способ трансдукции включает центрифужную инокуляцию, например, вращение или центрифугирование трансдуцируемой композиции и, необязательно, воздуха в центрифужной камере в

течение более чем или примерно 5 минут, например, более чем или примерно 10 минут, более чем или примерно 15 минут, более чем или примерно 20 минут, более чем или примерно 30 минут, более чем или примерно 45 минут, более чем или примерно 60 минут, более чем или примерно 90 минут или более чем или примерно 120 минут. В некоторых вариантах осуществления, трансдуцируемую композицию и, необязательно, воздуха вращают или центрифугируют в центрифужной камере в течение более чем 5 минут, но 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 или в течение примерно 60 минут.

В некоторых вариантах осуществления, способ трансдукции включает вращение или центрифугирование трансдуцируемой композиции и, необязательно, воздуха, в центрифужной камере в течение от или от примерно 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, все включительно, и с силой на внутренней поверхности боковой стенки внутренней полости и/или на поверхности слоя клеток, составляющей примерно или составляющей 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 трансдуцируемой композиции, например, клеток и частиц вирусного векторе, точно или примерно 1600 g в течение или в течение примерно 60 минут.

2. Частицы вирусного вектора

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки с применением частиц рекомбинантного инфекционного вируса, такого как, например, векторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированных вирусов (AAV). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки с применением рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10,1038/gt, 2014,25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557).

В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор имеет последовательность длинного концевого повтора (LTR), например, ретровирусного вектора, полученного из вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мыши (MESV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV) или вируса некроза селезенки (SFFV). Большинство ретровирусных векторов получают из ретровирусов мышей. В некоторых вариантах осуществления, ретровирусы включают такие, которые происходят из любого источника клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы обычно амфотропны, что означает, что они способны инфицировать клетки-хозяева нескольких видов, включая

человека. В одном варианте осуществления экспрессируемый ген заменяет ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (например, патенты США №№ 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; 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).

Геном вирусного вектора обычно конструируют в форме плазмиды, которая может быть трансфицирована в упаковывающую или продуцирующую клеточную линию. В любом из таких примеров, нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, вставляют или располагают в области вирусного вектора, например, обычно в не жизненно важной области вирусного генома. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновую кислоту вставляют в вирусный геном вместо определенных вирусных последовательностей для получения вируса, который является дефектным по репликации.

Любой из множества известных методов может применяться для получения ретровирусных частиц, геном которых содержит РНК копию генома вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, два компонента вовлечены в создание системы доставки генов на основе вируса: во-первых, упаковочные плазмиды, включающие структурные белки, а также ферменты, необходимые для генерации частиц вирусного облака, и, во-вторых, сам вирусный вектор, т.е. переносимый генетический материал. Гарантии биобезопасности могут быть включены в конструкцию одного или обоих этих компонентов.

В некоторых вариантах осуществления, упаковочная плазмида может содержать все ретровирусы, такие как HIV-1, белки, отличные от белков оболочки (Naldini et al., 1998). В других вариантах осуществления, вирусные векторы могут не содержать дополнительных вирусных генов, таких как гены, ассоциированные с вирулентностью, например vpr, vif, vpu и nef, и/или Tat, первичный трансактиватор HIV. В некоторых вариантах осуществления, лентивирусный вектор, такой как лентивирусный вектор на основе HIV, содержит только три гена родительского вируса: gag, pol и rev, что снижает или исключает возможность восстановления вируса дикого типа посредством рекомбинации.

В некоторых вариантах осуществления, геном вирусного вектора вводят в упаковывающую клеточную линию, которая содержит все компоненты, необходимые для упаковки вирусной геномной РНК, транскрибированной из генома вирусного вектора в вирусные частицы. Альтернативно, геном вирусного вектора может содержать один или более генов, кодирующих вирусные компоненты в дополнение к одной или более последовательностям, например, рекомбинантным нуклеиновым кислотам, представляющим интерес. В некоторых аспектах, однако, чтобы предотвратить репликацию генома в клетке-мишени, эндогенные вирусные гены, необходимые для репликации, удаляются и предоставляются отдельно в упаковывающей клеточной линии.

В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая клеточная линия трансфицирована одним или более плазмидными векторами, содержащими компоненты, необходимые для создания частиц. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая клеточная линия трансфицирована плазмидой, содержащей геном вирусного вектора, включая LTR, цис-действующую упаковывающую последовательность и последовательность, представляющую интерес, т.е. нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный рецептор, такой как CAR; и одну или более хелперных плазмид, кодирующих ферментные и/или структурные компоненты вируса, такие как Gag, pol и/или rev. В некоторых вариантах осуществления, несколько векторов используются для разделения различных генетических компонентов, которые генерируют частицы ретровирусного вектора. В некоторых таких вариантах осуществления, предоставление отдельных векторов в упаковывающие клетки снижает вероятность событий рекомбинации, которые в противном случае могли бы генерировать компетентные к репликации вирусы. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать единичный плазмидный вектор, содержащий все ретровирусные компоненты.

В некоторых вариантах осуществления, частицы ретровирусного вектора, такие как частицы лентивирусного вектора, псевдотипированы для повышения эффективности трансдукции клеток-хозяев. Например, частицы ретровирусного вектора, такие как частицы лентивирусного вектора, в некоторых вариантах осуществления, псевдотипированы с гликопротеином VSV-G, который обеспечивает широкий спектр клеток-хозяев, расширяя типы клеток, которые могут быть трансдуцированы. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая клеточная линия трансфицирована плазмидой или полинуклеотидом, кодирующим не нативную оболочку гликопротеина, например, включая ксенотропные, политропные или амфотропные оболочки, такие как оболочка вируса Sindbis, GALV или VSV-G.

В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая клеточная линия обеспечивает компоненты, включающие вирусные регуляторные или структурные белки, которые должны быть транс-активными для упаковки вирусной геномной РНК в частицы лентивирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающей клеточной линии может быть любая клеточная линия, которая способна экспрессировать лентивирусные белки и продуцировать функциональные частицы лентивирусного вектора. В некоторых аспектах, подходящие упаковывающие клеточные линии включают 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLA (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) и Cf2Th (ATCC CRL 1430) клетки.

В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая клеточная линия стабильно экспрессирует вирусный белок. Например, в некоторых аспектах, может быть сконструирована упаковывающая клеточная линия, содержащая gag, pol, rev и/или другие структурные гены, но без LTR и упаковывающих компонентов. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая клеточная линия может быть временно трансфицирована молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими один или более вирусных белков

вместе с геномом вирусного вектора, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок, и/или а нуклеиновой кислоты, кодирующей оболочечный гликопротеин.

В некоторых вариантах осуществления, вирусные векторы и упаковывающие и/или хелперные плазмиды вводят посредством трансфекции или инфицирования в упаковывающую клеточную линию. Упаковывающая клеточная линия продуцирует частицы вирусного вектора, содержащие геном вирусного вектора. Способы трансфекции или заражения хорошо известны. Неограничивающие примеры включают фосфат кальция, DEAE-декстран и методы липофекции, электропорации и микроинъекции.

Когда рекомбинантную плазмиду и ретровирусный LTR и упаковывающие последовательности вводят в специальную клеточную линию (например, путем преципитации фосфатом кальция, например), упаковывающие последовательности могут позволять упаковывать РНК транскрипт рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем могут быть секретированы в питательные среды. Затем, в некоторых вариантах осуществления, получают среду, содержащую рекомбинантные ретровирусы, необязательно концентрированную и используемую для переноса гена. Например, в некоторых аспектах, после котрансфекции упаковывающих плазмид и переноса вектора на упаковывающую клеточную линию, частицы вирусного вектора извлекают из культуральной среды и титруют стандартными методами, используемыми специалистами в данной области.

В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, может быть получен в упаковывающей клеточной линии, такой как типовая HEK 293T-клеточная линия, через введение плазмид, что позволяет создание лентивирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающие клетки трансфицированы и/или содержат полинуклеотид, кодирующий gag и pol, и полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, такой как антигенный рецептор, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая клеточная линия необязательно и/или дополнительно трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий rev белок. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая клеточная линия необязательно и/или дополнительно трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий не нативный гликопротеин, такой как VSV-G. В некоторых таких вариантах осуществления, приблизительно два дня после трансфекции клеток, например HEK 293T-клеток, супернатант клеток содержит рекомбинантные лентивирусные векторы, которые могут быть восстановлены или титрованы.

Восстановленные и/или полученные частицы ретровирусного вектора могут применяться для трансдуцирования клеток-мишеней с применением способов, как описано. Попадая в клетки-мишени, вирусная РНК подвергается обратной транскрипции, импортируется в ядро и стабильно интегрируется в геном хозяина. Через один или два дня после интеграции вирусной РНК можно обнаружить экспрессию рекомбинантного белка, например антигенного рецептора, такого как CAR.

3. Инкубирование с вирусным вектором

В конкретных вариантах осуществления, трансформация или трансдукция клеток является или включает одну или более стадий инкубирования клеток, например, в присутствии вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления, клеток, например, клетки трансформированой клеточной популяции инкубируют после генетического конструирования, трансформации, трансдуцирования или трансфицирования клеток.

В некоторых вариантах осуществления, инкубирование проводят в статических условиях, таких как условия, которые не включают центрифугирование, встряхивание, вращение, покачивание или перфузию, например, непрерывную или полунепрерывную перфузию среды. В некоторых вариантах осуществления, либо до, либо вскоре после, например, в пределах 5, 15 или 30 минут, инициирования инкубирования, клетки переносят (например, переносят в стерильных условиях) в контейнер, такой как пакет или флакон, и помещают в инкубатор.

В некоторых вариантах осуществления, инкубирование проводят в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда является охарактеризованной и/или хорошо охарактеризованной средой для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточной средой является контролируемая питательная среда, которая была обработана, например, отфильтрована для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит белки. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда может содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы прикрепления.

Условия могут включать одну или более конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание углекислого газа, время, агенты, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры связывания, слитые белки, рекомбинантный растворимый рецептор и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубирования проводят во внутренней полости центрифужной камеры, например, при центробежном вращении, например, как описано в международной публикации номер WO2016/073602.

В некоторых вариантах осуществления, клетки и, необязательно, гетерологичный или рекомбинантный полипептид, например, вирусные векторы, переносят в контейнер для инкубирования. В некоторых вариантах осуществления, контейнером является флакон. В конкретных вариантах осуществления, контейнером является 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 все или часть времени инкубирования. В

конкретных вариантах осуществления, инкубатор установлен на, на примерно или на, по меньшей мере, 16°C, 24°C или 35°C. В некоторых вариантах осуществления, инкубатор установлен на 37°C, на примерно на 37°C или на 37°C ±2°C, ±1°C, ±0,5°C или ±0,1°C.

В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в присутствии одного или более цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, один или более цитокинов являются рекомбинантными цитокинами. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов являются рекомбинантными цитокинами человека. В некоторых вариантах осуществления, один или более цитокинов связываются и/или способны связываться с рецепторами, которые экспрессированы и/или являются эндогенными к Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов являются или включают член 4-альфа-спираль-связанного семейства цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, члены 4-альфа-спираль-связанного семейства цитокинов включают, но не ограничены ими, 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 более цитокинов является или включает IL-15. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов является или включает IL-7. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов является или включает рекомбинантный IL-2.

В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в отсутствии рекомбинантных цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления, все или часть инкубирования проводят в минимальной среде. В некоторых вариантах осуществления, минимальной средой является сбалансированный солевой раствор (например, PBS, DPBS, HBSS, EBSS). В некоторых вариантах осуществления, минимальную среду выбирают из среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM), минимальной питательной среды (MEM), минимальной среды Игла (BME), F-10, F-12, PRMI 1640, минимальной питательной среды Глазго (GMEM), альфа минимальной питательной среды (альфа MEM), среды Дульбекко в модификации Искова и M199. В некоторых вариантах осуществления, минимальной средой является комплексная среда (например, PRMI-1640, IMDM). В некоторых вариантах осуществления, минимальной средой является OpTmizer™ CTS™ T-Cell Expansion Basal Medium (ThermoFisher).

В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда содержит смесь неорганических солей, сахаров, аминокислот и, необязательно, витаминов, органических кислот и/или буферов или других хорошо известных питательных веществ для культивирования клеток. Помимо питательных веществ, среда также помогает поддерживать pH и осмоляльность. В некоторых аспектах, реагенты минимальной среды поддерживают рост, пролиферацию и/или размножение клеток. Широкий спектр коммерчески доступных минимальных сред хорошо известен специалистам в данной

области техники и включает среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), среду Roswell Park Memorial Institute (PRMI), среду Дульбекко в модификации Искова и среду Хэмса. В некоторых вариантах осуществления, минимальной средой является среда Дульбекко в модификации Искова, PRMI-1640 или α-MEM.

В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда дополнена дополнительными добавками. В некоторых вариантах осуществления минимальная среда не дополнена какими-либо дополнительными добавками. Добавки к клеточной культуральной среде могут включать, помимо прочего, питательные вещества, сахара, например, глюкозу, аминокислоты, витамины или добавки, такие как ATP и NADH.

В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют с гетерологичным полинуклеотидом, например, вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют с полинуклеотидом, например, вирусным вектором, в течение, в течение примерно 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 некоторых вариантах осуществления, общая длительность инкубирования составляет, составляет примерно 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, инкубирование завершают в течение, в течение примерно или в течение 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 некоторых вариантах осуществления, общая длительность инкубирования составляет от или от примерно 12 часов до 120 часов, 18 часов и 96 часов, 24 часов и 72 часов или 24 часов и 48 часов, включительно. В некоторых вариантах осуществления, общая длительность инкубирования составляет от или примерно от 1 часа до 48 часов, 4 часов и 36 часов, 8 часов и 30 часов или 12 часов и 24 часов, включительно.

C. Культивирование

В конкретных вариантах осуществления, процессы создания композиций сконструированных Т-клеток, представленные в настоящем документе, проводят в связи с необязательной стадией культивирования или стадией, на которой клетки подвергают размножению или пролиферации in vitro, например, после введения гетерологичного полинуклеотида в клетку. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы включают одну или более стадий культивирования клеток, например, культивирования клеток в условиях, которые способствуют пролиферации или размножению. В некоторых вариантах осуществления, клетки культивируют в условиях, которые способствуют пролиферации или размножению после стадии генетического конструирования, например, введения рекомбинантного полипептида в клетку трансдукцией или трансфекцией. В конкретных вариантах осуществления, клетки культивируют после инкубирования клеток в условиях стимулирования и трансдуцирован или трансфицирования с рекомбинантным полинуклеотидом, например, полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. Таким образом, в некоторых

аспектах, клетки трансформированой популяции обогащенных Т-клеток культивируют. В конкретных вариантах осуществления, одну или более трансформированных популяций заранее истощают или отделяют от CD57+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, способы создания композиций сконструированных Т-клеток, представленных в настоящем документе, не требуют стадии культивирования или стадии, на которой клетки подвергают размножению или пролиферации in vitro после введения гетерологичного полинуклеотида в клетки. В некоторых вариантах осуществления, процесс или способ создания или производства сконструированных клеточных композиций не включают стадию культивирования, например, для размножения количества сконструированных клеток в терапевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления, одна или более популяций сконструированных Т-клеток являются или включают две отдельных популяции обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, две отдельных популяции обогащенных Т-клеток, например, две отдельных популяции обогащенных Т-клеток, селектированных, выделенных и/или обогащенных из одного биологического образца, отдельно культивируют в условиях стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, две отдельные популяции включают популяцию обогащенных CD4+ Т-клеток, например, обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, две отдельные популяции включают популяцию обогащенных CD8+ Т-клеток, например, обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, две отдельные популяции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток, например, две отдельные популяции обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток и обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток, отдельно культивируют, например, в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению. В некоторых вариантах осуществления, одну популяцию обогащенных Т-клеток культивируют, например, одну популяцию, включающую или содержащую CD57- CD4+ Т-клетки и CD57- CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, одной популяцией является популяция обогащенных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, одной популяцией является популяция обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток, которая была объединена из отдельных популяций до культивирования.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD4+ Т-клеток (например, CD57- CD4+ Т-клеток), которую культивируют, например, в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению, включает, по меньшей мере, точно или примерно 60%, по меньшей мере, точно или примерно 65%, по меньшей мере, точно или примерно 70%, по меньшей мере, точно или примерно 75%, по меньшей мере, точно или примерно 80%, по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 98%, по меньшей мере, точно или примерно 99%, по меньшей мере, точно или примерно 99,5%, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% или точно или

примерно 100% CD4+ Т-клеток (например, CD57- CD4+ Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления, популяция включает, по меньшей мере, точно или примерно 30%, по меньшей мере, точно или примерно 40%, по меньшей мере, точно или примерно 50%, по меньшей мере, точно или примерно 60%, по меньшей мере, точно или примерно 70%, по меньшей мере, точно или примерно 80%, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 98%, по меньшей мере, точно или примерно 99%, по меньшей мере, точно или примерно 99,5%, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% или точно или примерно 100% CD4+ Т (например, CD57- CD4+ Т-клеток) клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы с рекомбинантным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD4+ Т-клеток (например, CD57- CD4+ Т-клеток), которую культивируют, включает менее чем или примерно 40%, менее чем или примерно 35%, менее чем или примерно 30%, менее чем или примерно 25%, менее чем или примерно 20%, менее чем или примерно 15%, менее чем или примерно 10%, менее чем или примерно 5%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD8+ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую культивируют, например, в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению, включает, по меньшей мере, точно или примерно 60%, по меньшей мере, точно или примерно 65%, по меньшей мере, точно или примерно 70%, по меньшей мере, точно или примерно 75%, по меньшей мере, точно или примерно 80%, по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 98%, по меньшей мере, точно или примерно 99%, по меньшей мере, точно или примерно 99,5%, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% или точно или примерно 100% CD8+ Т-клеток (например, CD57- CD8+ Т-клеток). В конкретных вариантах осуществления, популяция включает, по меньшей мере, точно или примерно 30%, по меньшей мере, точно или примерно 40%, по меньшей мере, точно или примерно 50%, по меньшей мере, точно или примерно 60%,по меньшей мере, точно или примерно 70%,по меньшей мере, точно или примерно 80%, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 98%, по меньшей мере, точно или примерно 99%, по меньшей мере, точно или примерно 99,5%, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% или точно или примерно 100% CD8+ Т-клеток (например, CD57- CD8+ Т-клеток), которые экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или были трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных CD8+ Т-клеток, которую инкубируют в условиях стимулирования, включает менее чем или примерно 40%, менее чем или примерно 35%, менее чем или примерно 30%, менее чем или примерно 25%, менее чем или примерно

20%, менее чем или примерно 15%, менее чем или примерно 10%, менее чем или примерно 5%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD4+ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, культивирование проводят в условиях, которые в общем включают температуру, подходящую для роста первичных иммунных клеток, таких как Т-лимфоциты человека, например, по меньшей мере, точно или примерно 25 градусов Цельсия, в общем, по меньшей мере, точно или примерно 30 градусов, и в общем точно или примерно 37 градусов Цельсия. В некоторых вариантах осуществления, популяцию обогащенных Т-клеток инкубируют при температуре от 25 до 38°C, например, от 30 до 37°C, например точно или примерно 37°C ± 2°C. В некоторых вариантах осуществления, инкубирование проводят в течение периода времени, пока культивирование, например культивирование или размножение, дает желаемую или пороговую плотность, количество или дозу клеток. В некоторых вариантах осуществления, культивирование длится в течение более чем или более чем примерно или длится в течение примерно или 24 часов, 48 часов, 72 часов, 96 часов, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или более.

В некоторых вариантах осуществления, клетки культивируют до достижения порога размножения, который равен количеству, концентрации или плотности клеток, которое составляет, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, точно или примерно 60%, по меньшей мере, точно или примерно 70%, по меньшей мере, точно или примерно 80%, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 100%, по меньшей мере, точно или примерно 150%, по меньшей мере, точно или примерно 1-кратно, по меньшей мере, точно или примерно 2-кратно, по меньшей мере, точно или примерно 3-кратно, по меньшей мере, точно или примерно 4-кратно, по меньшей мере, точно или примерно 5-кратно, по меньшей мере, точно или примерно 10-кратно, по меньшей мере, точно или примерно 20-кратно, по меньшей мере, точно или примерно 50-кратно больше по сравнению с количеством, концентрацией или плотностью клеток в начале культивирования.

Как описано в примерах, количество дупликаций популяции обратно коррелируют с вероятностью выживания без прогрессирования у пациентов, леченных терапевтической композицией Т-клеток (например, выходящей композиции). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, количество дупликаций популяции составляет не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 или 10 дупликаций популяции. В некоторых вариантах осуществления, количество дупликаций популяции составляет не более чем 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дупликаций популяции. В некоторых вариантах осуществления, пониженное количество дупликаций популяции (например, менее чем или равное 6) достигается размножением композиции Т-клеток (например, сконструированных CD4+, CD+ 8 Т-клеток), которые включают, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% подобных наивным и/или

центральных Т-клеток памяти. В некоторых вариантах осуществления, пониженное количество дупликаций популяции (например, менее чем или равное 6) достигается размножением композиции Т-клеток (например, сконструированных CD4+, CD+ 8 Т-клеток), которые включают не более чем 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% CD57+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, пониженные количества дупликаций популяции (например, менее чем или равное 6) достигается при применении плотности посева более чем 0,05×10^6 клеток/мл, 0,1×10^6 клеток/мл, 0,15×10^6 клеток/мл, 0,2×10^6 клеток/мл, 0,25×10^6 клеток/мл, 0,3×10^6 клеток/мл, 0,35×10^6 клеток/мл, 0,4×10^6 клеток/мл, 0,45×10^6 клеток/мл или более.

Условия могут включать в себя одну или более конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание углекислого газа, время, агенты, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры связывания, слитые белки, рекомбинантный растворимый рецептор и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток.

В конкретных вариантах осуществления, композицию обогащенных Т-клеток культивируют в присутствии одного или более цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, один или более цитокинов являются рекомбинантными цитокинами. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов являются рекомбинантными цитокинами человека. В некоторых вариантах осуществления, один или более цитокинов связываются с и/или способны связываться с рецепторами, которые экспрессированы и/или являются эндогенными к Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов являются или включают член 4-альфа-спираль-связанного семейства цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, члены 4-альфа-спираль-связанного семейства цитокинов включают, но не ограничены ими, 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 более цитокинов является или включает IL-15. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов является или включает IL-7. В конкретных вариантах осуществления, один или более цитокинов является или включает рекомбинантный IL-2.

В некоторых аспектах, инкубирование проводят в соответствии с методами, описанными в патенте США № 6,040,1 77 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.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть культивирования проводят во внутренней полости центрифужной камеры, например, при центробежном вращении, например, как описано в международной публикации номер WO2016/073602. В

некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубирования, проводимая в центрифужной камере, включает смешивание с реагентом или реагентами, вызывающими стимулирование и/или активацию. В некоторых вариантах осуществления, клетки, такие как селектированные клетки, смешивают с условиями стимулирования или стимулирующим агентом в центрифужной камере. В некоторых аспектах таких процессов, объем клеток смешивают с количеством одной или более условий стимулирования или агентами, которое намного меньше, чем обычно применяется при проведении подобного стимулирования в планшете для культивирования клеток или другой системе.

В некоторых вариантах осуществления, культивирование проводят с добавлением буфера культивирования к клеткам и агента стимулирования для достижения целевого объема, например, 10 мл до 2000 мл, например, по меньшей мере, или примерно по меньшей мере, или примерно или 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 150 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл, 1000 мл, 1200 мл, 1400 мл, 1600 мл, 1800 мл, 2000 мл, 2200 мл или 2400 мл. В некоторых вариантах осуществления, буфер инкубирования и агент стимулирования предварительно смешивают до добавления к клеткам. В некоторых вариантах осуществления, стимулирование инкубированием проводят при периодическом осторожном перемешивании, которое может помочь энергетически благоприятным взаимодействиям и тем самым позволяет применение меньшего общего количества агента стимулирования при достижении стимулирования и активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления, инкубирование в общем проводят в условиях перемешивания, например, в присутствии вращения, в общем, при относительно низкой силе ли скорости, например, скорости ниже чем та, которую применяют для осаждения центрифугированием клеток, например, от или от примерно 600 об./мин. до 1700 об./мин. (например, точно или примерно или, по меньшей мере, 600 об./мин., 1000 об./мин. или 1500 об./мин. или 1700 об./мин.), например, при RCF на образце или стенке камеры или другого контейнера от или от примерно 80g до 100g (например, точно или примерно или, по меньшей мере, 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах осуществления, вращение проводят с применением повторяющихся интервалов вращения при такой низкой скорости после период отдыха, такого как вращение и/или отдых в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, при вращении при приблизительно 1 или 2 секунды после отдыха в течение приблизительно 5, 6, 7 или 8 секунд.

В конкретных вариантах осуществления, культивирование проводят в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления, культивирование проводят в закрытой системе в стерильных условиях. В конкретных вариантах осуществления, культивирование проводят в той же закрытой системе, что и одна или более стадий представленных систем. В некоторых вариантах осуществления, популяцию обогащенных Т-клеток удаляют из закрытой системы и помещают в и/или соединяют с биореактором для культивирования. Примеры подходящих биореакторов для культивирования

включают, но не ограничены ими, GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20|50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems и Pall XRS Bioreactor Systems. В некоторых вариантах осуществления, биореактор применяют для перфузии и/или смешивания клеток во время, по меньшей мере, части стадии культивирования.

В некоторых вариантах осуществления смешивание представляет собой или включает раскачивание и/или движение. В некоторых случаях, биореактор может подвергаться движению или раскачиванию, что, в некоторых аспектах, может увеличивать перенос кислорода. Движение биореактора может включать, но не ограничено ими, вращение по горизонтальной оси, вращение по вертикальной оси, качательное движение вдоль смещенной или наклонной горизонтальной оси биореактора или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубирование проводят при раскачивании. Скорость качания и угол качания можно регулировать для достижения желаемого перемешивания. В некоторых вариантах осуществления угол качания составляет 20°, 19°, 18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2° или 1°. В некоторых вариантах осуществления, угол качания составляет от 6-16°. В других вариантах осуществления, угол качания составляет от 7-16°. В других вариантах осуществления, угол качания составляет от 8-12°. В некоторых вариантах осуществления, скорость качания составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 об./мин. В некоторых вариантах осуществления, скорость качания составляет от 4 до 12 об./мин., например, от 4 до 6 об./мин., включительно.

В некоторых вариантах осуществления, биореактор сохраняет температуру, равную или около 37°C и уровни CO_2, равные или около 5% при стабильном потоке воздуха, равно, равном примерно или, по меньшей мере, 0,01 л/мин, 0,05 л/мин, 0,1 л/мин, 0,2 л/мин, 0,3 л/мин, 0,4 л/мин, 0,5 л/мин, 1,0 л/мин, 1,5 л/мин или 2,0 л/мин или больше чем 2,0 л/мин. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть культивирования проводят при перфузии, например, со скоростью 290 мл/день, 580 мл/день, и/или 1160 мл/день, например, в зависимости от времени относительно начала культивирования и/или плотности культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть размножения клеточной культуры проводят при качательном движении, например, под углом от 5° до 10°, например, 6°, при постоянной скорости качания, такой как скорость от 5 до 15 об./мин, например, 6 об./мин. или 10 об./мин.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть стадии культивирования проводят при постоянно перфузии, например, перфузии при медленной стабильной скорости. В некоторых вариантах осуществления, перфузия является или включает выходящий поток жидкости, например, использованной среды и входящий поток свежей среды. В некоторых вариантах осуществления, перфузия заменяет использованную среду на свежую среду. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть культивирования проводят при перфузии при стабильной скорости в

количестве или в количестве примерно или, в количестве, по меньшей мере, 100 мл/день, 200 мл/день, 250 мл/день, 275 мл/день, 290 мл/день, 300 мл/день, 350 мл/день, 400 мл/день, 450 мл/день, 500 мл/день, 550 мл/день, 575 мл/день, 580 мл/день, 600 мл/день, 650 мл/день, 700 мл/день, 750 мл/день, 800 мл/день, 850 мл/день, 900 мл/день, 950 мл/день, 1000 мл/день, 1100 мл/день, 1160 мл/день, 1200 мл/день, 1400 мл/день, 1500 мл/день, 1600 мл/день, 1800 мл/день, 2000 мл/день, 2200 мл/день или 2400 мл/день.

D. Сбор, получение и составление клеток

В некоторых вариантах осуществления, одна или более стадий процесса (например, проводимых в центрифужной камере и/или закрытой системе) для производства, создания или продуцирования клеточной терапии и/или сконструированных клеток могут включать составление клеток, например, составление генетически сконструированных клеток, полученных на представленных стадиях обработки трансдукцией до или после культивирования, например культивирования и размножения, и/или одну или более стадий обработки, как описано. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы, ассоциированные с составлением клеток, включают обработку трансдуцированных клеток, таких как клетки, трансдуцированные и/или размноженные с применением стадий обработки, описанных выше, в закрытой системе.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток до составления. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток после культивирования. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий агент удаляют и/или отделяют от клеток после культивирования и до составления культивированных клеток, например, в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующим реагентом является стимулирующий реагент, который описан в настоящем документе, например, в разделе III.A.1. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент удаляют и/или отделяют от клеток, как описано в настоящем документе, например, в разделе III.A.2.

В некоторых вариантах осуществления, клетками культивированной популяции клеток являются, в некоторых вариантах осуществления, клетками составленными от 0 дней до 10 дней, от 0 до 5 дней, от 2 дней до 7 дней, от 0,5 дней до 4 дней или от 1 дня до 3 дней после достижения порогового количества, плотности и/или размножения клеток во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки составлены точно или примерно в течение 12 часов, 18 часов, 24 часов, 1 дня, 2 дней или 3 дней после достижения порогового количества, плотности и/или размножения клеток во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки составлены в течение или в течение примерно 1 дня после достижения порогового количества, плотности и/или размножения клеток во время культивирования.

В некоторых вариантах осуществления, количество времени от начала стимулирования до получения, сбора или составления клеток составляет, составляет примерно или составляет менее чем 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 от начала стимулирования до получения, сбора или составления клеток составляет, составляет примерно или составляет менее чем 1,5 дней, 2 дней, 3 дней, 4 дней или 5 дней. В некоторых вариантах осуществления, количество времени от начала стимулирования до получения, сбора или составления клеток для создания сконструированных клеток, от начала стимулирования до получения, сбора или составления клеток составляет от или от примерно 36 часов до 120 часов, 48 часов до 96 часов или 48 часов до 72 часов, включительно или от или от примерно 1,5 дней до 5 дней, 2 дней до 4 дней или 2 дней и 3 дней, включительно. В конкретных вариантах осуществления, количество времени от начала инкубирования до получения, сбора или составления клеток составляет, составляет примерно или составляет менее чем 48 часов, 72 часов или 96 часов. В конкретных вариантах осуществления, количество времени от начала инкубирования до получения, сбора или составления клеток составляет, составляет примерно или составляет менее чем 2 дня, 3 дня или 4 дня. В конкретных вариантах осуществления, количество времени от начала инкубирования до получения, сбора или составления клеток составляет, составляет 48 часов ± 6 часов, 72 часов ± 6 часов или 96 часов ± 6 часов. В конкретных вариантах осуществления, количество времени от начала инкубирования до получения, сбора или составления клеток составляет, составляет примерно 96 часов или четыре дня.

В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают по меньшей мере, когда встроенный вектор определяют в геноме. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают до стабильного количества копий интегрированного вектора (iVCN) на диплоидном геноме. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или получают после определения интегрированного вектора в геноме, но до достижения стабильного iVCN на диплоидном геноме.

В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают до того, как iVCN достигает, достигает примерно или достигает, по меньшей мере, 5,0, 4,0, 3,0, 2,5, 2,0, 1,75, 1,5, 1,25, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,75, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3 или 0,25 копий на диплоидном геноме. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или получают до того, как iVCN достигает или достигает примерно 1,0 копии на диплоидном геноме. В некоторых вариантах осуществления, клетки получены или собраны до того, как iVCN достигает или достигает примерно 0,5 копии на диплоидном геноме.

В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают до, до примерно или до, по меньшей мере, одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, восьми, десяти, двадцати или более дупликаций клеток клеточной популяции, например, дупликаций, которые возникают во время инкубирования.

В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или получают в момент времени до того, как общее количество клеток, например, общее количество инкубированных клеток или клеток, подвергнутых инкубированию, станет более чем примерно один, два, три, четыре, пять, шесть, восемь, десять, двадцать или более чем

двадцать раз от количества клеток входной популяции, например, общего количества клеток, которые контактировали со стимулирующим реагентом. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают в момент времени до того, как общее количество инкубированных клеток станет более чем примерно один, два, три, четыре, пять, шесть, восемь, десять, двадцать или более чем двадцать раз от общего количества клеток входной популяции, например, общего количества клеток, которые были трансформированы, трансдуцированы или центрифужно инокулированы, например, общего количества клеток, которые контактируют с вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления, клетками являются Т-клетки, жизнеспособные Т-клетки, CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, CAR экспрессирующие Т-клетки или комбинация любых из вышеуказанных. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или получают в момент времени до того, как общее количество клеток составит более чем общее количество клеток входной популяции. В разных вариантах осуществления, клетки собирают или получают в момент времени до того, как общее количество жизнеспособных CD3+ Т-клеток составит более чем общее количество жизнеспособных CD3+ клеток входной популяции. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или получают в момент времени до того, как общее количество клеток составит более чем общее количество клеток трансформированных, трансдуцированных или центрифужно инокулированных клеток. В разных вариантах осуществления, клетки собирают или получают в момент времени до того, как общее количество жизнеспособных CD3+ Т-клеток составит более чем общее количество жизнеспособных CD3+ клеток трансформированных, трансдуцированных или центрифужно инокулированных клеток. В разных вариантах осуществления, клетки собирают или получают в момент времени до того, как общее количество жизнеспособных CD4+ клеток и CD8+ клеток составит более общего количества жизнеспособных CD4+ клеток и CD8+ клеток входной популяции. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или получают в момент времени до того, как общее количество клеток составит более чем общее количество клеток трансформированных, трансдуцированных или центрифужно инокулированных клеток. В разных вариантах осуществления, клетки собирают или получают в момент времени до того, как общее количество жизнеспособных CD4+ клеток и CD8+ клеток составит более чем общее количество жизнеспособных CD4+ клеток и CD8+ клеток трансформированных, трансдуцированных или центрифужно инокулированных клеток.

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы производства, создания или продуцирования клеточной терапии и/или сконструированных клеток могут включать составление клеток, такое как составление генетически сконструированных клеток, полученных на представленных стадиях обработки до или после инкубирования, конструирования и культивирования, и/или одной или более стадий обработки, как описано. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы, ассоциированные с составлением клеток, включают обработку трансдуцированных

клеток, таких как клетки, трансдуцированные и/или размноженные с применением стадий обработки, описанных выше, в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления, дозу клеток, содержащих клетки, сконструированные с рекомбинантным антигенным рецептором, например CAR или TCR, представлена в виде композиции или состава, такого как фармацевтическая композиция или состав. Такие композиции могут применяться в сочетании с представленными способами, такими как профилактика или лечение заболеваний, состояний и расстройств, или в способах определения, диагностики или прогнозирования.

В некоторых случаях, клетки обрабатывают за одну или более стадий (например, проводят в центрифужной камере и/или закрытой системе) для производства, создания или продуцирования клеточной терапии и/или сконструированных клеток, которые могут включать составление клеток, такое как составление генетически сконструированных клеток, получаемых на представленных стадиях трансдукции до или после культивирования, например культивирования и размножения, и/или одной или более других стадий обработки, как описано. В некоторых случаях, клетки могут быть составлены в количестве для введения дозировки, например, для введения одной стандартной дозированной формы или введения множества доз. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы, ассоциированные с составлением, включают обработку трансдуцированных клеток, таких как клетки, трансдуцированные и/или размноженные с применением стадий обработки, описанных выше, в закрытой системе.

В некоторых вариантах осуществления, составлены одна или более композиций, обогащенных Т-клетками. В конкретных вариантах осуществления, одна или более композиций обогащенных Т-клеток составлены после того, как одна или более композиций были сконструированы и/или культивированы. В конкретных вариантах осуществления, одна или более композиций являются входными композициями. В некоторых вариантах осуществления, одна или более входных композиций были ранее криоконсервированы и хранились и были размморожены до инкубирования.

В некоторых вариантах осуществления, составленные клетки являются выходными клетками. В некоторых вариантах осуществления, составленными композициями обогащенных Т-клеток являются выходные композиции обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, составленные CD4+ Т-клетки и составленные CD8+ Т-клетки являются выходными CD4+ и CD8+ Т-клетками. В конкретных вариантах осуществления, составленные клеточные композиции, например, составленные композиции обогащенных CD4+ и CD8+ клеток, являются выходными клеточными композициями, например, выходными композициями обогащенных CD4+ и CD8+ клеток.

В некоторых вариантах осуществления, клетки могут быть составлены в контейнер, такой как пакет или флакон. В некоторых вариантах осуществления, клетки составляют в течение от 0 дней до 10 дней, от 0 до 5 дней, от 2 дней до 7 дней, от 0,5 дней до 4 дней или от 1 дня до 3 дней после клеток после достижения порогового количества, плотности и/или размножения во время культивирования. В некоторых вариантах

осуществления, клетки составляют точно или примерно или в течение 12 часов, 18 часов, 24 часов, 1 дня, 2 дней или 3 дней после достижения порогового количества, плотности и/или размножения во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки составляют в течение или в течение примерно 1 дня после достижения порогового количества, плотности и/или размножения во время культивирования.

В некоторых вариантах осуществления, клетки культивируют в течение минимальной длительности или количества времени, например, так, что клетки собирают в менее активированном состоянии, чем если бы они были составлены в более ранний момент времени во время культивирования, независимо от того, когда достигнут порог. В некоторых вариантах осуществления, клетки культивируют через от 0 дней до 3 дней, например, от 0 до 3 дней, от 1 до 2 дней, точно или примерно 1 день, точно или примерно 2 дня или точно или примерно 3 дня после достижения порогового количества, плотности и/или размножения во время культивирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки активируют пороговое количество, плотность и/или размножение клеток и продолжают культивироваться в течение минимального количестве времени или длительности до составления. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые достигают порога, не являются составленными до тех пор, пока они культивируются в течение минимальной длительности и/или количества времени, такого как минимальное время или длительность от 1 дня до 14 дней, 2 дней и 7 дней или 3 дней и 6 дней или минимального времени или длительности культивирования в течение или в течение примерно 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или более чем 7 дней. В некоторых вариантах осуществления, минимальное время или длительность культивирования составляет от 3 дней до 6 дней.

В некоторых вариантах осуществления, клетки составлены в фармацевтически приемлемом буфере, который может, в некоторых аспектах, включать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В некоторых вариантах осуществления, обработка включает замену среды на среду или буфер для составления, которые фармацевтически приемлемы или желательны для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, стадии обработки могут включать промывание трансдуцированных и/или размноженных клеток для замены клеток в фармацевтически приемлемом буфере, который может включать один или более фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. Примерами таких фармацевтических форм, включающих фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты, могут быть любые, описанные ниже в связи с формами, приемлемыми для введения клеток и композиций субъекту. Фармацевтические композиции в некоторых вариантах осуществления содержат клетки в количествах, эффективных для лечения или профилактики заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтического состава, отличному от активного ингредиента, который не токсичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, без ограничения, буфер,

эксципиент, стабилизатор или консервант.

В некоторых аспектах, выбор носителя частично определяется конкретной клеткой и/или способом введения. Соответственно, существует множество подходящих составов. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. В некоторых аспектах используют смесь двух и более консервантов. Консервант или его смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,0001% до примерно 2% от общей массы композиции. Носители описаны, *например*, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители в целом не токсичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничены ими: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлические комплексы (*например*, Zn-белковые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

Буферные агенты в некоторых аспектах включены в композиции. Подходящие буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах, используют смесь двух или более буферных агентов. Буферный агент или его смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,001% до примерно 4% массовых от общей массы композиции. Способы получения вводимых фармацевтических композиций известны. Типовые способы описаны более подробно в, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

Составы могут включать водные растворы. Состав или композиция может также содержать более чем один активный ингредиент, полезный для конкретного показания, заболевания или состояния, излечиваемого клетками, предпочтительно такой, активность которого комплементарна клеткам, где соответствующие активности не влияют отрицательно друг на друга. Такие активные ингредиенты обычно присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для предполагаемой цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно включает другие фармацевтически активные агенты или лекарственные средства, такие

как химиотерапевтические агенты, *например*, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин и/или винкристин.

Композиции в некоторых вариантах осуществления представлены в виде стерильных жидких препаратов, *например*, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые, в некоторых аспектах, могут быть забуференными до выбранного pH. Жидкие композиции могут содержать носители, которые могут быть растворителем или диспергирующей средой, содержащее, например, воду, солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения клеток в растворитель, например в смеси с подходящим носителем, разбавителем или эксципиентом, таким как стерильная вода, солевой раствор, глюкоза, декстроза или подобные. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие, диспергирующие или эмульгирующие агенты (*например*, метилцеллюлозу), pH буферные агенты, гелеобразующие или повышающие вязкость добавки, консерванты, ароматизаторы и/или красители, в зависимости от пути введения и желаемого препарата. В некоторых случаях можно обратиться к стандартным текстам, чтобы подготовить подходящие препараты.

Могут быть добавлены различные добавки, которые повышают стабильность и стерильность композиций, включая противомикробные консерванты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и буферы. Профилактика действия микроорганизмов обеспечивается различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом и сорбиновой кислотой. Пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть достигнута за счет использования агентов, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

В некоторых вариантах осуществления, буфер для состава содержит криоконсервант. В некоторых вариантах осуществления, клетки составлены с помощью раствора криоконсерванта, который содержит от 1,0% до 30% раствора ДМСО, например от 5% до 20% раствора ДМСО или от 5% до 10% раствора ДМСО. В некоторых вариантах осуществления, криоконсервирующий раствор является или содержит, например, PBS, содержащий 20% ДМСО и 8% сывороточного альбумина человека (HSA), или другую подходящую среду для замораживания клеток. В некоторых вариантах осуществления, криоконсервирующий раствор является или содержит, например, по меньшей мере, или примерно 7,5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления, стадии обработки могут включать промывание трансдуцированных и/или размноженных клеток для замены клеток в криоконсервирующем растворе. В некоторых вариантах осуществления, клетки замораживают, например, криоконсервируют или криозащищают, в среде и/или растворе с конечной концентрацией в количестве или в количестве примерно 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% ДМСО или от 1% до 15%, от 6% до 12%, от 5% до 10% или от 6% до 8% ДМСО. В конкретных вариантах осуществления, клетки замораживают, например, криоконсервируют или криозащищают, в среде и/или растворе с конечной концентрацией в количестве или в количестве примерно 5,0%, 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,25%, 1,0%, 0,75%, 0,5% или 0,25% HSA или от 0,1% до -5%, от 0,25% до 4%, от 0,5% до 2% или от 1% до 2% HSA.

В конкретных вариантах осуществления, композицию обогащенных Т-клеток, например, Т-клеток, которые были стимулированы, сконструированы и/или культивированы, составляют, криоконсервируют и затем храня в течение количества времени. В некоторых вариантах осуществления, составленные криоконсервированные клетки хранят до тех пор, пока клетки высвобождают для инфузии. В конкретных вариантах осуществления, составленные криоконсервированные клетки хранят в течение от 1 дня до 6 месяцев, от 1 месяца до 3 месяцев, от 1 дня до 14 дней, от 1 дня до 7 дней, от 3 дней до 6 дней, от 6 месяцев до 12 месяцев или дольше 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, клетки криоконсервируют и хранят в течение, в течение примерно или в течение менее чем 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней. В некоторых вариантах осуществления, клетки размораживают и вводят субъекту после хранения. В некоторых вариантах осуществления, клетки хранят в течение или в течение примерно 5 дней.

В некоторых вариантах осуществления, составление проводят с использованием одной или более стадий обработки, включая промывку, разведение или концентрацию клеток, таких как культивируемые или размноженные клетки. В некоторых вариантах осуществления, обработка может включать разведение или концентрацию клеток до желаемой концентрации или количества, такой как единичная дозированная форма, включая количество клеток для введения в данной дозе или ее части. В некоторых вариантах осуществления, этапы обработки могут включать уменьшение объема, чтобы тем самым увеличить концентрацию клеток по желанию. В некоторых вариантах осуществления, стадии обработки могут включать добавление объема, чтобы тем самым снизить концентрацию клеток по желанию. В некоторых вариантах осуществления, обработка включает добавление объема буфера для составления к трансдуцированным и/или размноженным клеткам. В некоторых вариантах осуществления, объем буфера для составления составляет от или от примерно 10 мл до 1000 мл, например, по меньшей мере, или примерно по меньшей мере, или примерно или 50 мл, 100 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл или 1000 мл.

В некоторых вариантах осуществления, такие стадии обработки для составления клеточной композиции проводят в закрытой системе. Примеры таких стадий обработки могут быть выполнены с использованием центрифужной камеры в сочетании с одной или более системами или наборами, ассоциированными с системой обработки клеток, такой как центрифужная камера, производимых и продаваемых Biosafe SA, в том числе для

использования с системами обработки клеток Sepax® или Sepax 2®. Типовая система и способ описаны в международной публикации номер WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления, способ включает проведение экспрессии из внутренней полости центрифужной камеры составленных композиций, которые представляют собой полученные композиции клеток, составленных в буфере для составления, таком как фармацевтически приемлемый буфер, в любом из описанных выше вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления экспрессия составленных композиций производится в контейнер, такой как пакет, который функционально связан как часть закрытой системы с центрифужной камерой. В некоторых вариантах осуществления, контейнер, такой как пакет, подключают к системе на выходной линии или выходном положении.

В некоторых вариантах осуществления, закрытая система, такая как ассоциирована с центрифужной камерой или системой обработки клеток, включает многопортовый выходной комплект, содержащий многонаправленный трубчатый коллектор, связанный на каждом конце комплекта трубок с портом, к которому один или множество контейнеров могут быть присоединены для экспрессии составленной композиции. В некоторых аспектах, желаемое количество или множество выходных контейнеров, например, пакетов, могут быть стерильно соединены с одним или более, в общем с двумя или более, например, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более портов многопортового выхода. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или более контейнеров, например, пакетов, могут быть прикреплены к портам или менее чем ко всем портам. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, система может производить экспрессию выходной композиции во множество выходных пакетов.

В некоторых аспектах клетки могут быть экспрессированы в один или более выходных пакетов в количестве для дозированного введения, например, для введения однократной дозы или введения многократной дозы. Например, в некоторых вариантах осуществления, каждый выходной пакет может содержать количество клеток для введения данной дозы или ее части. Таким образом, каждый пакет в некоторых аспектах может содержать одну стандартную дозу для введения, или может содержать часть желаемой дозы, так что более чем один из множества выходных пакетов, таких как два выходных пакета или 3 выходных пакета, вместе составляют дозу для введения.

Таким образом, контейнеры, например, выходные пакеты, в общем, содержат вводимые клетки, например, одну или более их стандартных доз. Стандартной дозой может быть количество или количество клеток, вводимое субъекту, или удвоенное количество (или более) вводимых клеток. Это может быть наименьшая доза или наименьшая возможная доза для клеток, которую вводят субъекту.

В некоторых вариантах осуществления, каждый из контейнеров, например, пакетов, индивидуально содержит стандартную дозу клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, каждый из контейнеров содержит такое же или приблизительно или по существу такое же количество клеток. В некоторых вариантах осуществления,

каждая стандартная доза содержит, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, 1×10^6, 2×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7 или 1×10^8 сконструированных клеток, всего клеток, Т-клеток или PBMC. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом пакете составляет 10 мл до 100 мл, например, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл или 100 мл.

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

Е. Последовательное селектирование и параллельное селектирование

Способы, представленные в настоящем документе, позволяют проводить множество стадий селектирования, например, колоночной хроматографией, для выделения и/или обогащения таргетной клеточной популяции (например, Т-клеток, CD3+, CD4+, CD8+, CD57- Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий селектирования проводят в один или более моментов времени или после определенных стадий процесса для создания выходной терапевтической клеточной композиции. В некоторых вариантах осуществления, стадия селектирования включает множество стадий селектирования для, например, дальнейшей очистки клеточной композиции, селектирования определенных субтипов клеток, селектирования жизнеспособных клеток, селектирования сконструированных клеток и/или корректировки отношения, общего количества или концентрации клеток. В некоторых вариантах осуществления, стадию селектирования проводят до инкубирования. В некоторых вариантах осуществления, стадию селектирования проводят до сбора и получения.

В некоторых аспектах, такие способы (например, стадии селектирования) проводят в одном технологическом потоке, таким как закрытая система, с применением последовательного селектирования, при котором множество разных клеточных популяций из образца (например, выходные композиции стимулированных и/или сконструированных клеток), как представлено в настоящем документе, обогащают и/или выделяют. В некоторых аспектах, проведение отделения или выделения в одном и том же сосуде или наборе сосудов, например, комплекте трубок, достигается через проведение последовательных стадий положительного и отрицательного селектирования, где на последующей стадии подвергают отрицательную и/или положительную фракцию с предыдущей стадии дальнейшему селектированию, где весь процесс проводят в одной и той же трубке или комплекте трубок. В одном варианте осуществления, образец (например, выходную композицию стимулированных и/или сконструированных), содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному селектированию, в котором первое селектирование проводят для обогащения одной или более CD4+ или CD8+ популяций, и не селектированные клетки после первого селектирования применяют в качестве источника клеток для второго селектирования для обогащения других из CD4+ или CD8+ популяций. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное

селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения субпопуляций для одной или обеих CD4+ или CD8+ популяций, например, CD57- клеток. В некоторых вариантах осуществления, клеточную популяцию (например, выходную композицию стимулированных и/или сконструированных клеток), содержащую клетки-мишени, подвергают последовательному селектированию для жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления, отношение или общее количество клеток в клеточной популяции (например, выходной композиции стимулированных и/или сконструированных клеток), содержащей клетки-мишени, контролируют или корректируют.

В некоторых аспектах, такие способы (например, стадии селектирования) проводят в одном технологическом потоке, например, в закрытой системе, через применением множества последовательных селектирований, в котором множество разных клеточных популяций из образца (например, выходной композиции стимулированных и/или сконструированных клеток), как представлено в настоящем документе, являются обогащенными и/или выделенными. В некоторых аспектах, проведение отделения или выделения в одном и том же объеме или объемах, например, трубопроводе, достигается через проведение последовательных стадий отрицательного и положительного селектирования, где на последующей стадии отрицательную и/или положительную фракцию с предыдущей стадии подвергают последующему селектированию, где весь процесс проводят в одной и той же трубке или комплекте трубок. В одном варианте осуществления, образец (например, выходную композицию стимулированных и/или сконструированных клеток), содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному селектированию, при котором первое селектирование проводят для удаления CD57+ популяции. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения одной или более CD4+ или CD8+ популяции, например, CD57-CD4+ или CD57-CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, клеточную популяцию (например, выходную композицию стимулированных и/или сконструированных клеток), содержащую клетки-мишени, подвергают последовательному селектированию для жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления, отношение или общее количество клеток в клеточной популяции (например, выходной композиции стимулированных и/или сконструированных клеток), содержащей клетки-мишени, контролируют или корректируют.

В одном варианте осуществления, образец (например, выходную композицию стимулированных и/или сконструированных клеток), содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному селектированию, при котором первое селектирование проводят для обогащения для CD3+ популяции. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для субпопуляций CD3+ популяции, например, CD57- клеток. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут

быть проведены для обогащения для жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения субпопуляций CD57-CD3+ клеток, например CD3+CD57-CD4+ или CD57-CD3+CD8+ клеток, которые являются жизнеспособными. В некоторых вариантах осуществления, селектирование жизнеспособных клеток включает или состоит из удаления мертвых клеток из клеточной популяции (например, выходной композиции стимулированных и/или сконструированных клеток или их субпопуляции).

В одном варианте осуществления, образец (например, выходную композицию стимулированных и/или сконструированных клеток), содержащий клетки-мишени, подвергают последовательному селектированию, в котором первое селектирование проводят для удаления CD57+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для субпопуляций CD57- популяции, например, CD4+ и/или CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления, селектирование жизнеспособных клеток включает или состоит из удаления мертвых клеток из клеточной популяции (например, выходной композиции стимулированных и/или сконструированных клеток или их субпопуляций).

В некоторых вариантах осуществления, способы (например, стадии селектирования), описанные в этом разделе, не обязательно проводят с применением методов последовательного селектирования. В некоторых вариантах осуществления, способы (например, стадии селектирования), описанные в этом разделе, могут проводиться с применением методов последовательного селектирования в комбинации с методами параллельного селектирования. В некоторых вариантах осуществления, на стадии селектирования не применяют последовательное селектирование или могут применять последовательное селектирование, которое не происходит в закрытой системе или в ряду сосудов с применением одного и того же комплекта трубок. В некоторых вариантах осуществления, стадию селектирования проводят в одну стадию, например, с применением одной хроматографической колонки. В некоторых вариантах осуществления, стадию селектирования проводят с применением метода параллельного селектирования. Например, стадию селектирования проводят с применением стадий положительного и/или отрицательного селектирования одновременно, например, в закрытой системе, где весь процесс проводят в одной трубке или комплекте трубок. В некоторых вариантах осуществления, образец (например, выходящую композицию стимулированных и/или сконструированных клеток), содержащий клетки-мишени, подвергают параллельному селектированию, в котором образец (например, выходящую композицию стимулированных и/или сконструированных клеток) загружают в две или более хроматографических колонок, где каждая колонка проводит селектирование клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, две или более хроматографических колонок проводят селектирование CD57-, CD3+, CD4+ или CD8+

популяций индивидуально. В некоторых вариантах осуществления, две или более хроматографических колонок проводят селектирование одной и той же клеточной популяции. Например, две или более хроматографических колонок могут проводить селектирование CD57- клеток. В некоторых вариантах осуществления, две или более хроматографических колонок, включая аффинную хроматографию или гель-проникающую хроматографию, независимо проводят селектирование одной и той же клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, две или более хроматографических колонок, включая аффинную хроматографию или гель-проникающую хроматографию, независимо проводят селектирование разных клеточных популяций. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное селектирование или селектирования могут быть проведены для обогащения для субпопуляций одной или всех клеточных популяций, выбранных параллельным селектированием. В некоторых вариантах осуществления, образец (например, выходная композиция стимулированных и/или сконструированных клеток), содержащий клетки-мишени (например, CD57- клетки) подвергают параллельному селектированию, при котором параллельное селектирование проводят для обогащения для CD4+ популяции и CD8+ популяции или CD3+ популяции.

В некоторых вариантах осуществления, стадия селектирования может быть проведена с применением гранул, меченных агентами селектирования, как описано в настоящем документе, и положительные и отрицательные фракции после первой стадии селектирования могут сохраняться, с последующим дальнейшим положительным селектированием положительной фракции для обогащения для второго маркера селектирования, например, с применением гранул, меченных вторым агентом селектирования или с применением колоночной хроматографии положительной фракции, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления, одну или более стадий селектирования проводят с применением колоночной хроматографии, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, стадии селектирования проводят с применением одного или более способов, включая разделение гранул и колоночную хроматографию. В некоторых вариантах осуществления, селектирование осуществляют с применением колоночной хроматографии.

В некоторых аспектах, выделение множества популяций в одном или в одном и том же сосуде для выделения или сепараторе или ряде сосудов, таком как одна колонка или ряд колонок, и/или одной и той же трубке или комплекте трубок, или с применением одной и той же матрицы или среды или реагентов разделения, таких как одна и та же магнитная матрица, аффинно-меченная твердая подложка или антитела или другие партнеры связывания, включают характеристики, которые ускоряют выделение, например, дают снижение затрат, времени, сложности, необходимости обработки образцов, применение ресурсов, реагентов и оборудования. В некоторых аспектах, такие характеристики являются преимущественными в том, что они минимизируют затраты, эффективность, время и/или сложность, связанные со способами, и/или позволяют избежать потенциального повреждения клеточного продукта, такого как повреждение,

вызванное заражением, загрязнением и/или изменениями температуры. Способы, представленные в настоящем документе, позволяют проводить множество стадий селектирования для обогащения таргетных популяций как до, так и после селектирования клеток, объединенных стимулированием на колонке.

Способы, представленные в настоящем документе, дополнительно позволяют селектировать и обогащать успешно стимулированные и сконструированные клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления, методики последовательного селектирования, параллельного селектирования или отдельного селектирования, описанные выше, могут применяться для идентификации стимулированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы (например, CAR, TCR). В некоторых вариантах осуществления, клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор (например, CAR), могут быть дополнительно обогащены субпопуляцией клеток, например, CD4+ CAR+ Т-клеток, CD8+ CAR+ Т-клеток и/или жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления, стадия селектирования позволяет контролировать или корректировать отношение, концентрацию или общее количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR, TCR) и/или их субпопуляции. В некоторых вариантах осуществления, обогащенные популяции могут быть составлены для применения (например, введения) для клеточной терапии.

F. Типовые характеристики процесса

В некоторых аспектах, представленные способы и композиции относятся к популяциям Т-клеток, обогащенным CD57- Т-клетками. Конкретные варианты осуществления обращены к способам создания популяции обогащенных CD57- Т-клеток, например, отрицательным селектированием CD57+ клеток и, в некоторых аспектах, положительным селектированием Т-клеток, например, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток. Конкретные варианты осуществления относятся к способам создания популяции обогащенных CD57- Т-клеток, например, отрицательным селектированием CD57+ клеток и, в некоторых аспектах, положительным селектированием Т-клеток, таких как CD3+ Т-клетки. Определенные варианты осуществления относятся к способам инкубирования, стимулирования, активирования, конструирования, трансдуцирования, культивирования и/или размножения популяций обогащенных CD57- Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, инкубирование, стимулирование, активирование, конструирование, трансдуцирование, культивирование и/или размножение популяций обогащенных CD57- Т-клеток имеют преимущества над такими стадиями или процессами с альтернативными популяциями Т-клеток, такими, как популяции, содержащие количества или высокие количества CD57+Т-клеток. Такие преимущества включают, но не ограничены ими, улучшенную пролиферацию или размножение и меньшую дифференциацию, например, конечную дифференциацию.

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы являются или включают стадии обогащения Т-клеток, например, селектированием CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, с получением

популяции Т-клеток, истощенной CD57+ Т-клетками, например, популяции обогащенных CD57- Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяция содержит менее чем или менее чем примерно 10%, 5%, 1% или 0,1% CD57+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, популяция содержит менее чем или менее чем примерно 25%, 20%, 15%, 10% или 5% от частоты CD57+ Т-клеток, которые присутствуют в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 85%, 90%, 95% или 99% CD4+ Т-клеток популяции являются CD57-CD4+ Т-клетками. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере, 85%, 90%, 95% или 99% CD8+ Т-клеток популяции являются CD57-CD8+ Т-клетками. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере, 85%, 90%, 95% или 99% CD3+ Т-клеток популяции являются CD57-CD3+ Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления, обогащение Т-клеток включает селектирование или удаление CD57+ клеток из биологического образца и затем отдельное селектирование для CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток из популяции, отрицательно селектированной для CD57, например, с получением популяции обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток и популяции обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, эти популяции остаются отдельными, например, их затем отдельно криозащищают и хранят и/или отдельно конструируют для экспрессирования рекомбинантного рецептора. В конкретных вариантах осуществления, отдельные популяции объединяют, например, в отношении 1:1 CD57-CD4+ Т-клеток к CD57-CD8+ Т-клеткам.

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы являются или включают стимулирование популяций обогащенных CD57- Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы включают одну или более стадий стимулирования популяций обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, представленные способы включают одну или более стадий стимулирования популяций обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяции обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток и популяции обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток стимулированы, например, инкубированием клеток в условиях стимулирования, например, любых условиях стимулирования, описанных в настоящем документе, например, в разделе III.A. В конкретных вариантах осуществления, условия стимулирования являются или включают присутствие стимулирующего реагента. В некоторых вариантах осуществления, отдельные популяции обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток и обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток стимулированы по отдельности. В конкретных вариантах осуществления, отдельные популяции обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток и обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток объединяют или смешивают до стимулирования, например так, чтобы стимулировать комбинированную композицию обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток и CD57- CD8+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, способ или процесс стимулирования Т-клеток включает селектирование или удаление CD57+ клеток из биологического образца и

затем отдельное селектирование для CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток из популяции отрицательно селектированной для CD57, например, для создания популяции обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток и популяции обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, отдельные популяции обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток и обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток отдельно инкубируют в условиях стимулирования. В конкретных вариантах осуществления, отдельные популяции обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток и обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток комбинируют, например, отдельно инкубированные в условиях стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, стимулирование включает присутствие стимулирующего реагента. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент является или включает анти-CD3 и анти-CD28 антитело, конъюгированное с парамагнитной гранулой. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент является или включает олигомерную частицу мутеина стрептавидина с обратимо связанными анти-CD3 и анти-CD28 Fab.

В конкретных вариантах осуществления, представленные способы являются или включают генетически сконструированные популяции обогащенных CD57- Т-клеток, например, любыми способами, представленными в настоящем документе, например, в разделе III.B. В некоторых аспектах, гетерологичный полинуклеотид вводят в клеточные популяции, например, трансдукцией. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы включают одну или более стадий конструирования популяций, обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток или популяций клеток, которые происходят или получены из таких клеток. В конкретных вариантах осуществления, представленные способы включают одну или более стадий генетического конструирования популяций обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяции обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток и популяции обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток являются генетически сконструированными, например, трансдукцией с вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления, отдельные популяции обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток и обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток, например, стимулированных обогащенных CD57- CD4+ Т-клеток и стимулированных обогащенных CD57- CD8+ Т-клеток являются генетически сконструированными. В конкретных вариантах осуществления, одна популяция обогащенных CD57- Т-клеток, например, стимулированных CD57- Т-клеток, включающая обе CD57- CD4+ Т-клетки и CD57- CD8+ Т-клетки, например, стимулированные обогащенные CD57- CD4+ Т-клетки и стимулированные обогащенные CD57- CD8+ Т-клетки, являются генетически сконструированными.

В конкретных вариантах осуществления, способ генетического конструирования Т-клеток является или включает стадии селектирования или удаления CD57+ клеток из биологического образца и затем отдельное селектирование для CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток из популяции отрицательно селектированной для CD57, например, для создания популяции обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток и популяции обогащенных CD57-CD8+ Т-

клеток. В конкретных вариантах осуществления, отдельные популяции обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток и обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток отдельно генетически сконструированы. В конкретных вариантах осуществления, отдельные популяции обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток и обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток комбинируют до стадий генетического конструирования клеток. В некоторых аспектах, генетическое конструирование включает, является или включает введение гетерологичного полинуклеотида, например, кодирующего рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, введение является или включает стадии трансдукции, например, с центрифужной инокуляцией и, необязательно, последующим инкубированием в присутствии вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный полинуклеотид вводят любыми способами, представленными в настоящем документе, например, в разделе III.B. В конкретных вариантах осуществления, CD57-CD4+ Т-клетки и CD57-CD8+ Т-клетки стимулированы, например, любым способом, представленным в настоящем документе, например, в разделе III.A, до генетического конструирования.

В некоторых вариантах осуществления, генетическое конструирование проводят (a) инкубированием популяций обогащенных CD57- Т-клеток в присутствии стимулирующего реагента, способного активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул тем самым создавая стимулированную Т-клетку; (b) введением гетерологичного полинуклеотида в стимулированные Т-клетки первой и второй обогащенных популяций через трансдуцирование стимулированной Т-клетки вирусным вектором, содержащим гетерологичный полинуклеотид для создания трансформированной Т-клетки; (c) культивированием трансформированной Т-клетки в условиях, способствующих пролиферации или размножению трансформированной Т-клетки; и (d) сбором или получением размноженных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, способ генетического конструирования Т-клеток является или включает стадии селектирования или удаления CD57+ клеток из биологического образца и последующего отдельного селектирования для CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток из популяции, отрицательно селектированной для CD57, например, для создания популяции обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток и популяции обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, отдельные популяции обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток и обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток являются отдельно генетически сконструированными или являются комбинированными до одной или более стадий для генетического конструирования. В некоторых вариантах осуществления, CD57- CD4+ Т-клетки и CD57-CD8+ Т-клетки инкубируют в присутствии стимулирующего реагента, например, анти-CD3 и анти-CD28 антитела, конъюгированного с парамагнитной гранулой. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент является или включает олигомерную частицу мутеина стрептавидина с обратимо связанными анти-CD3 и анти-CD28 Fab, для стимулирования Т-

клеток до стадий введения гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, стимулированные CD57- CD4+ Т-клетки и CD57-CD8+ Т-клетки трансдуцированы вирусом, несущим гетерологичный полинуклеотид, например, с применением стадий, включающих центрифужную инокуляцию и/или инкубирование в присутствии вируса, например, с созданием трансформированных CD57- CD4+ Т-клеток и CD57-CD8+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, способ генетического конструирования Т-клеток является или включает стадии селектирования или удаления CD57+ клеток из биологического образца и последующего отдельного селектирования CD3+Т-клеток из популяции, отрицательно селектированной для CD57, например, для создания популяции обогащенных CD57-CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, CD57-CD3+ Т-клетки инкубируют в присутствии стимулирующего реагента, например, анти-CD3 и анти-CD28 антитела, конъюгированного с парамагнитной гранулой. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующий реагент является или включает олигомерную частицу мутеина стрептавидина с обратимо связанными анти-CD3 и анти-CD28 Fab, для стимулирования Т-клеток до стадий введения гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, стимулированные CD57-CD3+ Т-клетки трансдуцированы вирусом, несущим гетерологичный полинуклеотид, например, с применением стадий, включающих центрифужную инокуляцию и/или инкубирование в присутствии вируса, например, с получением трансформированных CD57-CD3+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, трансформированные Т-клетки культивируют в условиях, способствующих пролиферации или размножению трансформированных Т-клеток, например, в присутствии цитокинов, таких как IL-2, IL-7 или IL-15. В некоторых аспектах, клетки культивируют до достижения клетками, по меньшей мере, 3-кратного, 4-кратного или 5-кратного размножения.

В некоторых вариантах осуществления, размноженные клетки получают или собирают, например, для составления для криозащиты и хранения или для введения субъекту в виде клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, трансформированные клетки получают или собирают.

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы применяют в связи с последующим созданием или получением выходных композиций сконструированных Т-клеток, которые подходят для применения в клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, выходную композицию успешно создают, если клетки композиции достигают порогового количества, плотности и/или размножения клеток во время культивирования. В конкретных вариантах осуществления, представленные способы имеют, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 81%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 83%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 87%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 89%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по

меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% вероятность или возможность успешного создания или получения популяции Т-клеток, подходящей для клеточной терапии, например, из исходной популяции обогащенных Т-клеток или из биологического образца.

В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных Т-клеток, созданная представленными способами для применения в клеточной терапии, является активной и размножается и/или способна к активации и размножению, in vivo, при введении субъекту. В конкретных вариантах осуществления, клетки демонстрируют признаки и/или характеристики, которые указывают или ассоциированы с in vivo эффективности, активности и/или размножения. Например, в некоторых вариантах осуществления, такие признаки ил характеристики могут включать экспрессию белка, такого как поверхностный белок, который ассоциирован с активацией, пролиферацией и/или размножением после введения субъекту in vivo.

В некоторых вариантах осуществления, популяции обогащенных Т-клеток, которые созданы или получены представленными способами, например, для применения в клеточной терапии, имеют большую экспрессию CD25, чем клетки, которые созданы или получены альтернативным и/или типовым способом (например, способом стимулирования, конструирования и/или культивирования популяций Т-клеток, содержащих более высокую частоту CD57+ Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточная популяция, которая создана или получена представленными способами, имеет большую экспрессию CD25, чем Т-клетки, которые созданы или получены альтернативным и/или типовым способом. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%,по меньшей мере, 100% Т-клеток популяции, созданной представленным способом, являются положительными для CD25 окрашивания, например, экспрессируют определяемое количество CD25. В конкретных вариантах осуществления, выходная композиция содержит большую частоту клеток, которые являются положительными для CD25, чем композиция клеток, полученная или созданная альтернативным и/или типовым процессом. В некоторых вариантах осуществления, клеточные популяции экспрессируют, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%,по меньшей мере, 100%, по меньшей мере, 150%, по меньшей мере, 1-кратно, по меньшей мере, 2-кратно, по меньшей мере, 3-кратно, по меньшей мере, 4-кратно или по меньшей мере, 5-кратно, больше CD25, например, по сравнению с клетками, полученными или созданными альтернативными и/или типовыми процессами.

В некоторых вариантах осуществления, популяции обогащенных Т-клеток,

которые созданы или получены представленными способами, например, для применения в клеточной терапии, имеют большую экспрессию CD27, чем клетки, которые созданы или продуцированы альтернативным и/или типовым способом (например, способом стимулирования, конструирования и/или культивирования популяций Т-клеток, содержащих большую частоту CD57+ Т-клеток). В конкретных вариантах осуществления, Т-клетки популяции, которая создана или получена представленными способами, имеют большую экспрессию CD27, чем Т-клетки, которые созданы или получены альтернативным и/или типовым процессом. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%,по меньшей мере, 100%, Т-клеток популяции, созданной представленным способом, являются положительными для CD27 окрашивания, например, экспрессируют определяемое количество CD27. В конкретных вариантах осуществления, выходная композиция содержит большую частоту клеток, которые являются положительными для CD27, чем композиция клеток, полученная или созданная альтернативным и/или типовым способом. В некоторых вариантах осуществления, клеточные популяции экспрессируют, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%,по меньшей мере, 100%, по меньшей мере, 150%, по меньшей мере, 1-кратно, по меньшей мере, 2-кратно, по меньшей мере, 3-кратно, по меньшей мере, 4-кратно или по меньшей мере, 5-кратно, больше CD25, например, по сравнению с клетками, полученными или созданными альтернативным и/или типовым способом.

В конкретных вариантах осуществления, популяции обогащенных Т-клеток, которые создают или получают представленными способами, например, для применения в клеточной терапии, имеют большую экспрессию CD28, чем клетки, которые созданы или получены альтернативным и/или типовым способом (например, способом стимулирования, конструирования и/или культивирования популяций Т-клеток, содержащих более высокие частоты CD57+ Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки популяции, которая создана или получена представленными способами, имеют большую экспрессию CD28, чем Т-клетки, которые созданы ли получены альтернативным и/или типовым способом. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%,по меньшей мере, 100%, Т-клеток популяции, созданной представленным способом, являются положительными для CD28 окрашивания, например, экспрессируют определяемое количество CD28. В конкретных вариантах осуществления, выходная композиция содержит большую частоту клеток, которые являются положительными для CD28, чем

композиция клеток, полученная или созданная альтернативным и/или типовым способом. В некоторых вариантах осуществления, клеточные популяции экспрессируют, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%,по меньшей мере, 100%, по меньшей мере, 150%, по меньшей мере, 1-кратно, по меньшей мере, 2-кратно, по меньшей мере, 3-кратно, по меньшей мере, 4-кратно или по меньшей мере, 5-кратно, больше CD28, например, по сравнению с клетками, полученными или созданными альтернативным и/или типовым способом.

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы применяют в связи с успешным созданием или получением композиций сконструированных Т-клеток, которые подходят для применения в клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, композиция успешно создана, если клетки композиции достигают целевого количества, плотности и/или размножения клеток во время культивирования.

В конкретных вариантах осуществления, представленные способы имеют, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 81%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 83%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 87%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 89%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% вероятность или возможность успешного создания или получения популяции обогащенных Т-клеток, подходящих для клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, вероятность или возможность составляет от 85% до 100%, от 90% до 95% или от 92% до 94%. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы позволяют успешно создать или получить популяцию обогащенных Т-клеток, подходящую для клеточной терапии из, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 81%, по меньшей мере, 82%, по меньшей мере, 83%, по меньшей мере, 84%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 86%, по меньшей мере, 87%, по меньшей мере, 88%, по меньшей мере, 89%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% образцов или популяций обогащенных CD57- Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, общая длительность представленного процесса создания сконструированных клеток, от начала стимулирования до получения, сбора или составления клеток составляет, составляет примерно или составляет менее чем 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, общая длительность представленного способа создания сконструированных клеток, от начала стимулирования до получения, сбора или составления клеток составляет, составляет примерно или составляет менее чем

1,5 дня, 2 дня, 3 дня, 4 дня или 5 дней. В некоторых вариантах осуществления, общая длительность представленного способа создания сконструированных клеток, от начала стимулирования до получения, сбора или составления клеток составляет от или от примерно 36 часов и 120 часов, 48 часов и 96 часов или 48 часов и 72 часов, включительно, или от или от примерно 1,5 дней и 5 дней, 2 дней и 4 дней или 2 дней и 3 дней, включительно. В конкретных вариантах осуществления, количество времени для завершения представленного процесса, измеренное от начала инкубирования до сбора, получения или составления клеток, составляет, составляет примерно или составляет менее чем 48 часов, 72 часов или 96 часов или составляет, составляет примерно или составляет менее чем 2 дня, 3 дня или 4 дня. В конкретных вариантах осуществления, количество времени для завершения представленного процесса, измеренное от начала инкубирования до сбора, получения или составления клеток, составляет 48 часов ± 6 часов, 72 часов ± 6 часов или 96 часов ± 6 часов.

В некоторых вариантах осуществления, инкубирование завершают в течение от или от примерно 24 часов и 120 часов, 36 часов и 108 часов, 48 часов и 96 часов или 48 часов и 72 часов, включительно, от начала стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, инкубирование завершают в течение, примерно или в пределах 120 часов, 108 часов, 96 часов, 72 часов, 48 часов или 36 часов от начала стимулирования. В конкретных вариантах осуществления, инкубирование завершают через 24 часа ± 6 часов, 48 часов ± 6 часов или 72 часа ± 6 часов. В некоторых вариантах осуществления, инкубирование завершают в течение от или от примерно одного дня и 5 дней, 1,5 дней и 4,5 дней, 2 дней и 4 дней или 2 дней и 3 дней, включительно, после инициации стимулирования. В некоторых вариантах осуществления, инкубирование завершают в течение, примерно или в пределах 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней или 1,5 дней от начала стимулирования.

В некоторых вариантах осуществления, весь процесс проводят с одной популяцией обогащенных Т-клеток, например, CD4+ и CD8+ Т-клеток или CD3+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, процесс проводят с двумя или более входными популяциями обогащенных Т-клеток (например, CD4 и CD8 клеток), которые объединяют до и/или во время процесса для создания или получения одной выходной популяции обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, обогащенные Т-клетки являются или включают сконструированные Т-клетки, например, Т-клетки, трансдуцированные для экспрессии рекомбинантного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления, выходную популяцию, например, популяцию сконструированных Т-клеток, создают (i) инкубированием входной популяции, содержащей Т-клетки, в условиях стимулирования в течение от или от примерно 18 и 30 часов, включительно, (ii) введением гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в Т-клетки стимулированной популяции, (iii) инкубированием клеток и затем (iv) получением или сбором инкубированных клеток.

В некоторых вариантах осуществления, клетки получены или собраны в пределах от 36 до 108 часов или от 1,5 дней и 4,5 дней после начала инкубирования в условиях стимулирования. В конкретных вариантах осуществления, клетки получают или собирают в пределах 48 часов или двух дней после того как трансформированные (например, генетически сконструированные, трансдуцированные или трансфицированные) Т-клетки достигнут стабильного интегрированного количества копий вектора (iVCN) на геном, которое не повышается или не понижается на более чем 20% в пределах интервала 24-48 часов или от одного до двух дней. В некоторых вариантах осуществления, интеграция считается стабильной, когда измеренный iVCN клеточной популяции составляет в пределах или в пределах примерно 20%, 15%, 10% или 5% от общего количества копий вектора (VCN), измеренных в популяции. Конкретные варианты осуществления предполагают, что для достижения стабильной интеграции клетки должны быть инкубированы в течение, в течение примерно или в течение, по меньшей мере, 48 часов, 60 часов или 72 часов или одного дня, 2 дней или 3 дней, после контакта или введения вирусного вектора в клетки. В некоторых вариантах осуществления, стабильная интеграция происходит в течение или в течение примерно 72 часов инкубирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки получают или собирают в момент времени, когда общее количество трансформированных Т-клеток равно или меньше, чем общее количество клеток входной популяции. В разных вариантах осуществления, клетки получают или собирают в момент времени до того, как клетки входной популяции будут удвоены более чем в три, два или один раз.

В некоторых вариантах осуществления, выходную популяцию, например, популяцию сконструированных Т-клеток, создают (i) инкубированием входной популяции, содержащей Т-клетки в условиях стимулирования в течение от 18 до 30 часов, включительно, в присутствии стимулирующего реагента, например, стимулирующего реагента, описанного в настоящем документе, (ii) трансдуцированием стимулированных Т-клеток вирусным вектором, кодирующим рекомбинантный рецептор, например, центрифужной инокуляцией стимулированных Т-клеток в присутствии вирусного вектора, (iii) инкубированием трансдуцированных Т-клеток в статических условиях в течение от или от 18 часов и 96 часов, включительно, и (iv) сбором Т-клеток трансформированной популяции в течение от или от примерно 36 и 108 часов после начала инкубирования в условиях стимулирования.

В некоторых вариантах осуществления, процесс, ассоциированный с представленными способами, сравнивают с альтернативным процессом. Например, в некоторых вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем документе, сравнивают с альтернативным процессом, который включает стадию размножения клеток. В конкретных вариантах осуществления, альтернативный процесс может отличаться одним или более специфическими аспектами, но в остальном имеет одинаковые или такие же признаки, аспекты, стадии этапы, реагенты и/или условия, что и процесс, ассоциированный с представленными способами. В некоторых вариантах осуществления,

альтернативный процесс является аналогичным процессу, ассоциированному с представленными способами, например, не имеет или не включает размножение, но отличается тем, что включает, но не ограничен ими, одно или более из; другие реагенты и/или составы сред; присутствие сыворотки во время инкубирования, трансдукции, трансфекции и/или культивирования; другой клеточный состав входной популяции, например, отношение CD4+ к CD8+ Т-клеткам; другие условия стимулирования и/или другой стимулирующий реагент; другое отношение стимулирующего реагента к клеткам; другой вектор и/или способ трансдукции; другое время или порядок инкубирования, трансдуцирования и/или трансфицирования клеток; отсутствие или отличие одного или более рекомбинантных цитокинов, присутствующих во время инкубирования или трансдукции (например, другие цитокины или другие концентрации) или другое время сбора или получения клеток.

В некоторых вариантах осуществления, длительность или количество времени, требуемого для завершения представленного процесса, измеренное от выделения, обогащения и/или селектирования входных клеток (например, CD4+ или CD8+ Т-клеток) из биологического образца до времени, в которое получают, составляют и/или криозащищают выходные клетки, составляет, оставляют примерно или составляет менее чем 48 часов, 72 часов, 96 часов, 120 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 7 дней или 10 дней. В некоторых вариантах осуществления, выделенные, селектированные или обогащенные клетки не криозащищают до стимулирования, и длительность или количество времени, требуемого для завершения представленного процесса, измеренное от выделения, обогащения и/или селектирования входных клеток до времени, в которое получают, составляют и/или криозащищают выходные клетки, составляет, составляет примерно или составляет менее чем 48 часов, 72 часов, 96 часов или 120 часов или 2 дня, 3 дня, 4 дня или 5 дней.

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы проводят на популяции клеток, например, CD4+ т CD8+ Т-клеток или CD3+ клеток, которые выделяют, обогащают или селектируют из биологического образца. В некоторых аспектах, представленные способы могут давать или создавать композицию сконструированных Т-клеток из биологического образца, полученного от субъекта, в пределах сокращенного количества времени по сравнению с другими способами или процессами. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы могут давать или создавать сконструированные Т-клетки, включая любое или все время, когда биологические образцы или обогащенные, выделенные или селектированные клетки криоконсервируют и хранят до стадий стимулирования или трансдукции, в течение или в течение примерно 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней или в течение или в течение примерно 120 часов, 96 часов, 72 часов или 48 часов, от момента, когда биологический образец получен от субъекта до момента, когда сконструированные Т-клетки получены, собраны или составлены (например, для криоконсервации или введения). В конкретных вариантах осуществления, представленные

способы могут давать или создавать сконструированные Т-клетки, включая любое или все время, когда биологические образцы или обогащенные, выделенные или селектированные клетки криоконсервируют и хранят до стадий стимулирования или трансдукции, в пределах от или от примерно 6 дней до 8 дней, включительно, от момента, когда биологический образец получены от субъекта, до момента, когда сконструированные Т-клетки получены, собраны или составлены.

IV. ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ, КОДИРУЮЩИЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы являются или включают введение гетерологичного полинуклеотида в клетки популяции обогащенных CD57- клеток. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичный полинуклеотид кодирует рекомбинантный белок. Такие рекомбинантные белки могут включать рекомбинантные рецепторы, такие как любые, описанные в разделе III.A. Введение полинуклеотидов, например, гетерологичных или рекомбинантных полинуклеотидов, кодирующих рекомбинантный белок, в клетку может быть проведено с применением любого количества известных векторов. Такие векторы включают вирусные, включая лентивирусные и гаммаретровирусные, системы. Типовые способы включают таковые для переноса гетерологичных полинуклеотидов, кодирующих рецепторы, включая перенос через вирусную, например, ретровирусную или лентивирусную, трансдукцию. В некоторых вариантах осуществления, популяция стимулированных клеток генетически сконструирована так, чтобы вводить гетерологичный или рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, тем самым создавая популяцию трансформированных клеток (также названную в настоящем документе трансформированная популяция клеток).

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный белок, например рекомбинантный рецептор, вводят в клетки. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты гетерологична к клеткам. В конкретных вариантах осуществления, гетерологичный полинуклеотид не является нативным к клеткам. В некоторых вариантах осуществления, гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты или гетерологичный полинуклеотид кодирует белок, например, рекомбинантный белок, который в природе экспрессируется клеткой. В конкретных вариантах осуществления, гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотид является или содержит последовательность нуклеиновых кислот, которая не найдена в клетке до контакта или введения.

В конкретных вариантах осуществления, гетерологичный полинуклеотид кодирует рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным белком является рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным белком является рекомбинантный антигенный рецептор, такой как рекомбинантный TCR, или химерный антигенный рецептор (CAR).

A. Рекомбинантные рецепторы

В некоторых вариантах осуществления, представлены сконструированные клетки, такие как CD57- Т-клетки, которые экспрессируют или сконструированы для экспрессии одного или более рекомбинантных рецепторов. Рецепторы включают антигенные рецепторы и рецепторы, содержащие один или более их компонентов. Рекомбинантные рецепторы могут включать химерные рецепторы, такие, которые содержат лиганд-связывающие домены или их связывающие фрагменты и внутриклеточные сигнальные домены или области, функциональные не-TCR антигенные рецепторы, химерные антигенные рецепторы (CAR), Т-клеточные рецепторы (TCR), такие как рекомбинантные или трансгеннные TCR, химерный рецептор аутоантитела (CAAR) и компоненты любых их вышеперечисленных. Рекомбинантный рецептор, такой как CAR, в общем включает внеклеточный антиген- (или лиганд-) связывающий домен, связанный с одним или более внутриклеточными сигнальными компонентами, в некоторых аспектах, через линкеры и/или трансмембранные домены. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки экспрессируют два или более рецепторов, которые содержат разные компоненты, домены или области. В некоторых аспектах, два или более рецепторов позволяют пространственное или временное регулирование или контроль специфичности, активности, антигенного (или лигандного) связывания, функции и/или экспрессии рекомбинантных рецепторов.

1. Химерные антигенные рецепторы (CAR)

В некоторых вариантах осуществления представленных способов и применений, химерные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы, содержат один или более доменов, которые объединяет лиганд-связывающий домен (например антитело или фрагмент антитела), который обеспечивает специфичность для желаемого антигена (например, опухолевого антигена) с внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен является стимулирующей или активирующей частью внутриклеточного домена, такой как стимулирующий или активирующий Т-клетку домен, обеспечивающей первичный сигнал активации или первичный сигнал. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит или дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен для усиления эффекторных функций. В некоторых вариантах осуществления, химерные рецепторы, будучи генетически сконструированными в иммунных клетках, могут модулировать активность Т-клетки и, в некоторых случаях, могут модулировать дифференциацию или гемостаз Т-клетки, тем самым давая генетически сконструированные клетки м улучшенной продолжительностью жизни, выживаемостью и/или жизнестойкостью in vivo, например, для применения в способах адоптивной клеточной терапии.

Типовые антигенные рецепторы, включая CAR, и способы конструирования и введения таких рецепторов в клетки включают такие, которые описаны, например, в публикациях международных патентных заявок №№ WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061,

публикациях заявок на патент США №№ US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США №№: 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353 и 8,479,118 и европейской патентной заявке № EP2537416, и/или такие, которые описаны 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, антигенные рецепторы включают CAR, как описано в патенте США №: 7,446,190 и такие, которые описаны в публикации международной патентной заявки №: WO/2014055668 A1. Примеры CAR включают CAR, которые описаны в любой из вышеупомянутых публикаций, например, WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, патент США №: 7,446,190, патенте США №: 8,389,282, 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 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, патент США №: 7,446,190 и патент США №: 8,389,282.

Химерные рецепторы, такие как CAR, в общем включают внеклеточный антигенсвязывающий домен, такой как часть молекулы антитела, в общем, вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и/или вариабельную область легкой цепи (V_L) антитела, например, scFv фрагмент антитела.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном-мишенью для рецептора является полипептид. В некоторых вариантах осуществления, он является углеводом или другой молекулой. В некоторых вариантах осуществления, антиген селективно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках заболевания или состояния, например, опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления, антиген экспрессирован на нормальных клетках и/или экспрессирован на сконструированных клетках.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном-мишенью для рецептора является или включает αvβ6 интегрин (avb6 интегрин), антиген созревания B-клетки (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), антиген рака яичек, антиген рака/яичек 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, C-C мотив хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, протеогликан сульфата хондроитина 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), мутацию рецептора эпидермального фактора роста III типа (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфринB2, эфриновый рецептор A2 (EPHa2), рецептор эстрогена, Fc рецептор подобный 5 (FCRL5; также известный как Fc рецептор гомолог 5 или FCRH5), фетальный ацетилхолиновый рецептор (фетальный AchR), фолатный связывающий белок (FBP), фолатный рецептор альфа,

ганглиозид GD2, O-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), сопряженный с G-белком рецептор 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторную тирозинкиназу erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), erbB димеры, высокомолекулярный меланома-ассоциированный антиген человека (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита B, лейкоцитарный антиген человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарный антиген человека A2 (HLA-A2), IL-22 рецептор альфа(IL-22Rα), IL-13 рецептор альфа 2 (IL-13Rα2), рецептор со встроенным киназным доменом (kdr), легкую цепь каппа, L1 молекулу клеточной адгезии (L1-CAM), CE7 эпитоп L1-CAM, член семейства A содержащий богатые лейцином повторы 8 (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), c-Met, цитомегаловирус мыши (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды члена D группы 2 натуральных киллеров (NKG2D), мелан A (MART-1), нервную молекулу клеточной адгезии (NCAM), онкоэмбриональный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), прогестероновый рецептор, простат-специфический антиген, антиген стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфический мембранный антиген (PSMA), орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивин, трофобласт гликопротеин (TPBG также известный как 5T4), опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), тирозиназа-зависимый белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), тирозиназа-зависимый белок 2 (TRP2, также известный как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR), рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2), опухоль Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или патоген-экспрессированный антиген или антиген, ассоциированный с универсальной меткой и/или биотинилированные молекулы и/или молекулы, экспрессированные HIV, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены-мишени для рецепторов в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные со злокачественной B клеткой, например, любое количество известных маркеров B-клетки. В некоторых вариантах осуществления, антиген является или включает CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b или CD30.

В некоторых вариантах осуществления, антиген является или включает патоген-специфический или патоген-экспрессированный антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген является вирусным антигеном (таким как вирусный антиген из HIV, HCV, HBV, и т.д.), бактериальными антигенами и/или паразитарными антигенами.

В некоторых вариантах осуществления, антиген или антигенсвязывающий домен является CD19. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит VH и VL, полученные из антитела или фрагмента антитела, специфического к CD19. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, который связывает CD19 является антителом, полученным от мыши, таким как FMC63 и SJ25C1. В некоторых вариантах осуществления, антителом или фрагментом антитела является антитело человека, например, как описано в публикации патенте США № US 2016/0152723.

В некоторых вариантах осуществления, scFv получают из FMC63. FMC63 в общем относится к моноклональному IgG1 антителу мыши, индуцированному против Nalm-1 и -16 клеток, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., et al. (1987). Leucocyte typing III. 302). В некоторых вариантах осуществления, FMC63 антитело содержит CDRH1 и H2, указанные в SEQ ID NOS: 38 и 39, соответственно, и CDRH3 указанную в SEQ ID NO: 40 или 54, и CDRL1, указанную в SEQ ID NO: 35, и CDR L2, указанную в SEQ ID NO: 36 или 55, и CDR L3, указанную в SEQ ID NO: 37 или 56. В некоторых вариантах осуществления, FMC63 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и вариабельная область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит вариабельную легкую цепь, содержащую CDRL1 последовательность SEQ ID NO:35, CDRL2 последовательность SEQ ID NO:36 и CDRL3 последовательность SEQ ID NO:37, и/или вариабельную тяжелую цепь, содержащую CDRH1 последовательность SEQ ID NO:38, CDRH2 последовательность SEQ ID NO:39 и CDRH3 последовательность SEQ ID NO:40. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит вариабельную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO:41, и вариабельную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная тяжелая и вариабельная легкая цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления, линкер указан в SEQ ID NO:58. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку, V_H, линкер и V_L. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку, V_L, линкер и V_H. В некоторых вариантах осуществления, scFv кодирован последовательностью нуклеотидов, указанной в SEQ ID NO:43 или последовательностью, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к SEQ ID NO:43. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:43 или последовательность которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к SEQ ID NO:43.

В некоторых вариантах осуществления, scFv получают из SJ25C1. SJ25C1 является моноклональным IgG1 антителом мыши, активированным против Nalm-1 и -16 клеток, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., et al. (1987). Leucocyte typing III. 302). В некоторых вариантах осуществления, SJ25C1 антитело содержит CDRH1, H2 и H3 указанные в SEQ ID NOS: 47-49, соответственно, и CDRL1, L2 и L3 последовательности, указанные в SEQ ID NOS: 44-46, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, SJ25C1 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51.

В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит вариабельную легкую цепь, содержащую CDRL1 последовательность SEQ ID NO:44, CDRL2 последовательность SEQ ID NO: 45 и CDRL3 последовательность SEQ ID NO:46, и/или вариабельную тяжелую цепь, содержащую CDRH1 последовательность SEQ ID NO:47, CDRH2 последовательность SEQ ID NO:48 и CDRH3 последовательность SEQ ID NO:49. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит вариабельную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO:50 и вариабельную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO:51. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная тяжелая и вариабельная легкая цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления, линкер указан в SEQ ID NO:52. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку, V_H, линкер и V_L. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку, V_L, линкер и V_H. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:53, или последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к SEQ ID NO:53.

В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент антитела. В некоторых аспектах, химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент включает scFv.

В некоторых вариантах осуществления, часть антитела рекомбинантного рецептора, например, CAR, дополнительно включает, по меньшей мере, часть константой области иммуноглобулина, такую как шарнирная область, например, IgG4 шарнирная область, и/или C_H1/C_L и/или Fc область. В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть принадлежит IgG человека, такому как IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах, часть константой области служит в качестве спейсерной области между антигенраспознающим компонентом, например, scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, которая обеспечивает повышенную отвечаемость клетки после связывания с антигеном, по сравнению с отсутствием спейсера. Типовые спейсеры включают, но не ограничены ими, описанные у Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, в публикации международной патентной заявки № WO2014031687, патенте США № 8,822,647 или опубликованной заявке № US2014/0271635.

В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть принадлежит IgG человека, такому как IgG4 или IgG1. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность ESKYGPPCPPCP (указанную в SEQ ID NO: 1) и кодирован последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть принадлежит IgD. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет

последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к любой из SEQ ID NOS: 1, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, указанную в SEQ ID NOS: 27-34. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к любой из SEQ ID NOS: 27-34.

В некоторых вариантах осуществления, антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен, связанный прямо или косвенно с внеклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор включает трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит ITAM. Например, в некоторых аспектах, антигенраспознающий домен (например, внеклеточный домен) в общем связан с одним или более внутриклеточными сигнальными компонентами, такими как сигнальные компоненты, которые имитируют активацию через комплекс антигенного рецептора, такой как TCR комплекс, в случае CAR, и/или сигнал через другой рецептор клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор содержит трансмембранный домен, связанный или конденсированный между внеклеточным доменом (например, scFv) и внутриклеточным сигнальным доменом. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий компонент (например, антитело) связан с одним или более трансмембранными и внутриклеточными сигнальными доменами.

В одном варианте осуществления, применяют трансмембранный домен, который в природе ассоциирован с одним из доменов в рецепторе, например, CAR. В некоторых случаях, трансмембранный домен выбирают или модифицируют аминокислотной заменой для того, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами на одном и том же или разных белках мембранной поверхности для минимизации взаимодействий с другими членами рецепторного комплекса.

Трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления получают либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, домен в некоторых аспектах получают из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранный области включают такие, которые получены из (т.е., содержат, по меньшей мере, трансмембранные области) альфа, бета или дзета цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Альтернативно, трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления является синтетическим. В некоторых аспектах, синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах,

триплет фенилаланина, триптофана и валина найден на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, связь происходит через линкеры, спейсеры и/или трансмембранные домены. В некоторых аспектах, трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28.

В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен и трансмембранный домен могут быть связаны прямо или косвенно. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен и трансмембранный домен связаны спейсером, таким как любой, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, рецептор содержит внеклеточную часть молекулы, из которой получен трансмембранный домен, такую как CD28 внеклеточная часть.

Внутриклеточные сигнальные домены включают такие, которые имитируют или аппроксимируют сигнал через природный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором, и/или сигнал через только костимулирующий рецептор. В некоторых вариантах осуществления, короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, например, содержащий глицины и серины, например, дублет глицин-серин, присутствует и образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

Активация Т-клеток в некоторых аспектах описана как опосредованная двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: такими, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и такими, которые действуют антиген-независимым образом, чтобы обеспечить вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). В некоторых аспектах, CAR включает один или оба таких сигнальных компонента.

Рецептор, например, CAR, в общем включает по меньшей мере, один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты. В некоторых аспектах, CAR включает первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует первичную активацию TCR комплекса. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют как стимуляторы, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают таковые, полученные из CD3 дзета цепи, FcR гамма, CD3 гамма, CD3 дельта и CD3 эпсилон. В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматические сигнальные молекулы в CAR содержат цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, полученную из CD3 дзета.

В некоторых вариантах осуществления, рецептор включает внутриклеточный компонент TCR комплекса, такой как TCR CD3 цепь, которая опосредует активацию Т-клеток и цитотоксичность, например, CD3 дзета цепи. Таким образом, в некоторых

аспектах, антигенсвязывающая часть связана с одной или более клеточными сигнальными модулями. В некоторых вариантах осуществления, клеточные сигнальные модули включают CD3 трансмембранный домен, CD3 внутриклеточные сигнальные домены и/или другие CD трансмембранные домены. В некоторых вариантах осуществления, рецептор, например, CAR, дополнительно включает часть одной или более дополнительных молекул, таких как Fc рецептор γ, CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах, CAR или другой химерный рецептор включает химерную молекулу между CD3-дзета (CD3-ζ) или Fc рецептором γ и CD8, CD4, CD25 или CD16.

В некоторых вариантах осуществления, при лигировании CAR или другого химерного рецептора, цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен рецептора активирует, по меньшей мере, одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки, например, Т-клетки, сконструированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых контекстах, CAR индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическая активность или Т-хелперная активность, такая как секретирование цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления, усеченную часть внутриклеточного сигнального домена антигенного рецепторного компонента или костимулирующей молекулы применяют вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если она трансдуцирует сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен или домены включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и, в некоторых аспектах, также таковые корецепторов, которые в природном контексте действуют согласованно с такими рецепторами для инициации трансдукции сигнала после соединения антигенного рецептора.

В контексте природного TCR, полная активация в общем требует не только подачи сигнала через TCR, то также костимулирующего сигнала. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, чтобы способствовать полной активации, компонент для создания вторичного или костимулирующего сигнала также включен в CAR. В других вариантах осуществления, CAR не включает компонент для создания костимулирующего сигнала. В некоторых аспектах, дополнительный CAR экспрессирован в той же клетке и представляет компонент для создания вторичного или костимулирующего сигнала.

В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен Т-клеточной костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления, CAR включает сигнальный домен и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, например, CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 и ICOS. В некоторых аспектах, один и тот же CAR включает и активирующий, и костимулирующий компоненты. В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен, полученный из Т-клеточной костимулирующей молекулы или ее функционального варианта, например, между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых аспектах, Т-клеточной костимулирующей молекулой является CD28 или 41BB.

В некоторых вариантах осуществления, активирующий домен включен в один CAR, в то время как костимулирующий компонент представлен другим CAR, распознающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления, CAR включают активирующие или стимулирующие CAR, костимулирующие CAR, оба которые экспрессированы на одной и той же клетке (см. WO2014/055668). В некоторых аспектах, клетки включают один или более стимулирующих или активирующих CAR и/или костимулирующий 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, распознающий антиген, отличный от ассоциированного с и/или специфического для заболевания или состояния, в то время как активирующий сигнал, доставляемый через болезнь-таргетный CAR уменьшается или ингибируется связыванием ингибирующего CAR с его лигандом, например, для снижения нецелевых эффектов.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит CD28 трансмембранный и сигнальный домен связанный с CD3 (например, CD3-дзета) внутриклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит химерный CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9) костимулирующие домены, связанные с CD3 дзета внутриклеточным доменом.

В некоторых вариантах осуществления, CAR охватывает один или более, например, два или более костимулирующих доменов и активирующих доменов, например, первичный активирующий домен, в цитоплазматической части. Типовые CAR включают внутриклеточные компоненты CD3-дзета, CD28 и 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления, антигенный рецептор дополнительно включает маркер, и/или клетки, экспрессирующие CAR или другой антигенный рецептор, дополнительно включают суррогатный маркер, такой как маркер клеточной поверхности, который может применяться для подтверждения трансдукции или конструирования клетки для экспрессии рецептора. В некоторых аспектах, маркер включает весь или часть (например, усеченную форму) CD34, NGFR или рецептора эпидермального фактора роста, например, усеченную версию такого рецептора клеточной поверхности (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как отщепляемая линкерная последовательность, например, T2A. Например, маркером и, необязательно, линкерной последовательностью может быть любая, описанная в опубликованной патентной заявке № WO2014031687. Например, маркер может быть усеченным EGFR (tEGFR) который, необязательно, связан с линкерной последовательностью, такой как T2A отщепляемая линкерная последовательность.

Типовой полипептид для усеченного EGFR (например, tEGFR) содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 7 или 16, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%,

87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к SEQ ID NO: 7 или 16. Типовая T2A линкерная последовательность содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 6 или 17, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к SEQ ID NO: 6 или 17.

В некоторых вариантах осуществления, маркером является молекула, например, белок клеточной поверхности, не найденный в природе на Т-клетке или не найденный на поверхности Т-клетки или ее части. В некоторых вариантах осуществления, молекулой является «не свой» белок, т.е., такой, который распознается как «свой» иммунной системой хозяина, которому адоптивно переносят клетки.

В некоторых вариантах осуществления, маркер не служит терапевтической функции и/или не оказывает действие, отличное от применения в качестве маркера для генетического конструирования, например, для селектирования успешно сконструированных клеток. В других вариантах осуществления, маркером может быть терапевтическая молекула или молекула, другим образом оказывающая желаемый эффект, такая как лиганд для клетки, встречающейся in vivo, такой как костимулирующая молекула или молекула контрольной иммунной точки для улучшения и/или ослабления ответов клеток при адоптивном трансфере и встрече с лигандом.

В некоторых случаях, CAR обозначают как CAR первого, второго и/или третьего поколения. В некоторых аспектах, CAR первого поколения является такой, который один предоставляет индуцированный CD3-цепью сигнал при связывании с антигеном; в некоторых аспектах, CAR второго поколения является такой, который обеспечивает подобный сигнал и костимулирующий сигнал, например, индуцируемый внутриклеточным сигнальным доменом из костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах, CAR третьего поколения является такой, который включает множество костимулирующих доменов или разных костимулирующих рецепторов.

Например, в некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который является или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть CD28 или ее функциональный вариант, и сигнальную часть CD3 дзета или ее функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который является или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть 4-1BB или ее функциональный вариант, и сигнальную часть CD3 дзета или ее функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления, рецептор дополнительно включает спейсер, содержащий часть Ig молекулы, такой как молекула Ig человека, такую как Ig шарнир, например, IgG4 шарнир, такой как только шарнирный

спейсер.

В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен рекомбинантного рецептора, например, CAR, является или включает трансмембранный домен CD28 человека (например № доступа P01747.1) или его вариант, такой как трансмембранный домен, который содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к SEQ ID NO: 8; в некоторых вариантах осуществления, часть рекомбинантного рецептора, содержащая трансмембранный домен, содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, имеющую, по меньшей мере, точно или примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к ней.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные сигнальные компоненты рекомбинантного рецептора, *например,* CAR, содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека или функциональный вариант или его часть, такой как домен с LL - GG заменой в положениях 186-187 нативного CD28 белка. Например, внутриклеточный сигнальный домен может содержать последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 10 или 11, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB (например, номер доступа № Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, такую как последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 12, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен рекомбинантного рецептора, *например,* CAR, содержит стимулирующий сигнальный домен CD3 дзета человека или его функциональный вариант, например, 112 AA цитоплазматический домен изоформы 3 CD3ζ человека (№ доступа: P20963.2) или сигнальный домен CD3 дзета, как описано в патенте США №: 7,446,190 или патенте США № 8,911,993. Например, в некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к SEQ ID NO: 13, 14 или 15.

В некоторых аспектах, спейсер содержит только шарнирную область IgG, например, только шарнир IgG4 или IgG1, например, только шарнирный спейсер,

указанный в SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления, спейсер является или содержит Ig шарнир, например, IgG4-полученный шарнир, необязательно, связанный с C_H2 и/или C_H3 доменами. В некоторых вариантах осуществления, спейсером является Ig шарнир, например, IgG4 шарнир, связанный с C_H2 и C_H3 доменами, такой как указан в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, спейсером является Ig шарнир, например, IgG4 шарнир, связанный только с C_H3 доменом, такой как указан в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер является или содержит глицин-серин-богатую последовательность, или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры.

Например, в некоторых вариантах осуществления, CAR включает антитело, такое как фрагмент антитела, включая scFvs, спейсер, такой как спейсер, содержащий часть иммуноглобулиновой молекулы, такую как шарнирная область и/или одна или более константных областей тяжелой цепи молекулы, такую как Ig-шарнир, содержащий спейсер, трансмембранный домен, содержащий весь или часть CD28-полученного трансмембранного домена, CD28-полученного внутриклеточного сигнального домена и CD3 дзета сигнального домена. В некоторых вариантах осуществления, CAR включает антитело или фрагмент, такой как scFv, спейсер, такой как любой из Ig-шарниров, содержащих спейсеры, CD28-полученный трансмембранный домен, 4-1BB-полученный внутриклеточный сигнальный домен и CD3 дзета-полученный сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие такие CAR конструкции, дополнительно включают последовательность, кодирующую T2A элемент проскока рибосомы и/или tEGFR последовательность, например, ниже последовательности, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления, последовательность кодирует T2A элемент проскока рибосомы, указанный в SEQ ID NO: 6 или 17, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к SEQ ID NO: 6 или 17. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки, экспрессирующие антигенный рецептор (например, CAR), также могут быть созданы для экспрессии усеченного EGFR (EGFRt) в качестве не имуногенного селектирующего эпитопа (например, через введение конструкции, кодирующей CAR и EGFRt, разделенные T2A рибосомным переключателем для экспрессии двух белков из одной конструкции), который может применяться в качестве маркера для определения таких клеток (см., например, патент США № 8,802,374). В некоторых вариантах осуществления, последовательность кодирует tEGFR последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7 или 16, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к SEQ ID NO: 7 или 16. В некоторых случаях, пептид, такой как T2A, может вызвать то, что рибосома пропустит (проскок рибосомы) синтез пептидной связи на С-конце 2A элемента, что приведет к разделению между концом 2A последовательности и

следующим пептидом ниже (см., например, de Felipe. Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) и deFelipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)). Многие 2A элементы известны. Примеры 2A последовательностей, которые могут применяться в способах и нуклеиновых кислотах, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, 2A последовательности из вируса ящура (F2A, *например*, SEQ ID NO: 21), вируса ринита лошадей A (E2A, *например*, SEQ ID NO: 20), вируса Thosea asigna (T2A, *например*, SEQ ID NO: 6 или 17) и тешовируса-1 свиней (P2A, *например*, SEQ ID NO: 18 или 19), как описано в публикации патенте США № 20070116690.

Рекомбинантные рецепторы, такие как CAR, экспрессированные клетками, введенными субъекту, в общем, распознают или специфически связываются с молекулой, которая экспрессирована в, ассоциирована с и/или является специфической для лечимого заболевания или состояния или их клеток. При специфическом связывании с молекулой, например, антигеном, рецептор в общем доставляет иммуностимулирующий сигнал, такой как ITAM-трансдуцированный сигнал, в клетку, тем самым способствуя иммунному ответу, таргетированному к заболеванию или состоянию. Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки экспрессируют CAR, который специфически связывается с антигеном, экспрессированным клетками или тканью заболевания или состояния, или ассоциированной с заболеванием или состоянием.

2. Т-*клеточные рецепторы (TCR)*

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки, такие как Т-клетки, применяют в связи с представленными способами, применениями, изделиями производства или композициями, являются клетками, которые экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающую часть, которая распознает пептидный эпитоп или Т-клеточный эпитоп полипептида-мишени, такой как антиген опухоли, вирусный или аутоиммунный белок.

В некоторых вариантах осуществления, «Т-клеточный рецептор» или «TCR» является молекулой, которая содержит вариабельные α и β цепи (также известный как TCRα и TCRβ, соответственно) или вариабельные γ и δ цепи (также известный как TCRα и TCRβ, соответственно) или их антигенсвязывающие части, и которая способна специфически связываться с пептидной связью на MHC молекуле. В некоторых вариантах осуществления, TCR имеет αβ форму. Обычно TCR, которые существует в αβ и γδ формах, являются в общем структурно аналогичными, но экспрессирующие их Т-клетки могут иметь разные анатомические локации или функции. TCR может быть найден на поверхности клетки или в растворимой форме. В общем, TCR найден на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он в общем отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC).

Если не указано иное, термин «TCR» должен пониматься как охватывающий полноразмерные TCR, а также их антигенсвязывающие части или антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления, TCR является интактным или полноразмерным TCR, включая TCR в форме αβ или форме γδ. В некоторых вариантах

осуществления, TCR является антигенсвязывающей частью, которая меньше, чем полноразмерный TCR, но которая связывается со специфическим пептидом, связанным в MHC молекуле, например, связывается с MHC-пептидным комплексом. В некоторых случаях, антигенсвязывающая часть или фрагмент TCR может содержать только часть структурных доменов полноразмерного или интактного TCR, а также способна связывать пептидный эпитоп, такой как комплекс MHC-пептид, с которым связывается полноразмерный TCR. В некоторых случаях, антигенсвязывающая часть содержит вариабельные домены TCR, такие как вариабельная α цепь и вариабельная β цепь TCR, достаточные для формирования сайта связывания для связывания со специфическим MHC-пептидным комплексом. В общем, вариабельные цепи TCR содержат определяющие комплементарность области, вовлеченные в распознавание пептида, MHC и/или комплекса MHC-пептид.

В некоторых вариантах осуществления, вариабельные домены TCR содержат гипервариабельные петли или определяющие комплементарность области (CDR), которые, в общем, являются первыми участниками антигенраспознающих и связывающих способностей и специфичности. В некоторых вариантах осуществления, CDR TCR или их сочетания образуют все или по существу все антигенсвязывающие сайты данной TCR молекулы. Разные CDR в пределах вариабельной области TCR цепи в общем разделены каркасными областями (FR), которые, в общем, демонстрируют меньшую вариабельность среди TCR молекул по сравнению с CDR (см., например, Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988; см. также Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). В некоторых вариантах осуществления, CDR3 является основной CDRЮ отвечающей за связывание антигена или специфичность, или является наиболее важной среди трех CDR на данной TCR вариабельной области для распознавания антигена и/или для взаимодействия с обработанной пептидной частью комплекса пептид-MHC. 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 играет наибольшую роль или является первичной CDR, отвечающей за взаимодействие с или распознавание комплекса MHC-пептид. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область β-цепи может содержать дополнительную гипервариабельную область (CDR4 или HVR4), которая, в общем, вовлечена в связывание суперантигена, но не в распознавание антигена (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

В некоторых вариантах осуществления, TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический хвост (см., например, Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). В некоторых аспектах, каждая цепь TCR может обладать одним N-концевым иммуноглобулиновым вариабельным доменом, одним иммуноглобулиновым константным доменом, трансмембранной областью и коротким

цитоплазматическим хвостом на С-конце. В некоторых вариантах осуществления, TCR ассоциирован с инвариантными белками CD3 комплекса, вовлеченными в опосредование сигнала трансдукции.

В некоторых вариантах осуществления, TCR цепь содержит один или более константных доменов. Например, внеклеточная часть данной TCR цепи (например, α-цепи или β-цепи) может содержать два иммуноглобулин-подобных домена, такого как вариабельный домен (например, Vα или Vβ; обычно аминокислоты 1-116 по нумерации Кэбота, 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, α-цепь константного домена или Cα, обычно положения 117-259 цепи по нумерации Кэбота, или константный домен β цепи или Cβ, обычно положения 117-295 цепи по Кэботу) соседние к клеточной мембране. Например, в некоторых случаях, внеклеточная часть TCR, образованная двумя цепями, содержит два константных домена, проксимальных к мембране, и два вариабельных домена, дистальных к мембране, где каждый из вариабельных доменов содержит CDR. Константный домен TCR может содержать соединительные последовательности, в которых цистеиновые остатки образуют дисульфидную связь, тем самым связывая две цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR может иметь дополнительный цистеиновый остаток в каждой из α и β цепей, так, что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

В некоторых вариантах осуществления, TCR цепи содержат трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен положительно заряжен. В некоторых случаях, TCR цепь содержит цитоплазматический хвост. В некоторых случаях, структура позволяет TCR связываться с другими молекулами, такими как CD3 и его субъединицы. Например, TCR, содержащий константные домены с трансмембранной областью могут удерживать белок в мембране клетки и связываться с инвариантными субъединицами CD3 сигнального аппарата или комплекса. Внутриклеточные хвосты CD3 сигнальных субъединиц (например CD3γ, CD3δ, CD3ε и CD3ζ цепи) содержат один или более иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов или ITAM, которые вовлечены в сигнальную емкость TCR комплекса.

В некоторых вариантах осуществления, TCR может быть гетеродимером из двух цепей α и β (ли, необязательно γ и δ) или он может быть одноцепочечной TCR конструкцией. В некоторых вариантах осуществления, TCR является гетеродимером, содержащим две отдельные цепи (α и β цепи или γ и δ цепи), которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями.

В некоторых вариантах осуществления, TCR может быть создан из известных TCR последовательностей, таких как последовательности Vα,β цепей, для которых по существу полноразмерная кодирующая последовательность легко доступна. Способы получения полноразмерных TCR последовательностей, включая последовательности V цепи, из клеточных источников хорошо известны. В некоторых вариантах осуществления,

нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, могут быть получены из множества источников, таких как амплификация полимеразной цепной реакции (PCR) или TCR-кодирующие нуклеиновые кислоты, находящиеся в или выделенные из данной клетки или клеток, или синтез общедоступных TCR ДНК последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления, TCR получают из биологического источника, например, из клеток, например, из Т-клеток (например, цитотоксических Т-клеток), гибридом Т-клеток или других общедоступных источников. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки могут быть получены из in vivo выделенных клеток. В некоторых вариантах осуществления, TCR является тимусно выбранным TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR является неоэпитоп-ограниченным TCR. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки могут быть культивированной гибридомой или клоном Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающая часть или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть синтетически созданы с применением знания последовательности TCR.

В некоторых вариантах осуществления, TCR создают из TCR, идентифицированной или выбранной скринингом библиотеки кандидатных TCR против полипептидного антигена-мишени или его эпитопа Т-клетки-мишени. TCR библиотеки могут быть созданы амплификацией репертуара Vα и Vβ из Т-клеток, выделенных у субъекта, включая клетки, присутствующие в PBMC, селезенке или другого лимфоидного органа. В некоторых случаях, Т-клетки могут быть амплифицированы из инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL). В некоторых вариантах осуществления, TCR библиотеки могут быть созданы из $CD4^+$ или $CD8^+$ клеток. В некоторых вариантах осуществления, TCR могут быть амплифицированы из источника Т-клеток нормального или здорового субъекта, т.е. библиотек нормальных TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR могут быть амплифицированы из источника Т-клеток больного субъекта, т.е. библиотек больных TCR. В некоторых вариантах осуществления, вырожденные праймеры применяют для амплификации генного репертуара Vα и Vβ, например, RT-PCR в образцах, например, Т-клетках, полученных от человека. В некоторых вариантах осуществления, scTv библиотеки могут быть собраны из библиотек наивных Vα и Vβ, в которых амплифицированные продукты клонированы или собраны для разделения линкером. В зависимости от источника субъекта и клеток, библиотеки могут быть HLA аллель-специфическими. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, TCR библиотеки могут быть созданы мутагенезом или диверсификацией исходных или каркасных TCR молекул. В некоторых аспектах, TCR подвергают направленному развитию, такой как мутагенез, например, α или β цепи. В некоторых аспектах, конкретные остатки в пределах CDR TCR изменяют. В некоторых вариантах осуществления, выбранные TCR могут быть модифицированы через созревание аффинности. В некоторых вариантах осуществления, антиген-специфические Т-клетки могут быть выбраны, например, скринингом, для оценки CTL активности против пептида. В некоторых аспектах, TCR, например, присутствующие на антиген-специфических Т-

клетках, могут быть выбраны, например, через активность связывания, например, конкретную аффинность или авидность для антигена.

В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающая часть модифицированы или сконструированы. В некоторых вариантах осуществления, способы направленного развития применяют для создания TCR с измененными свойствами, такими как более высокая аффинность для специфического комплекса MHC-пептид. В некоторых вариантах осуществления, направленное развитие достигается способами дисплея, включающими, но не ограниченными или, дрожжевой дисплей (Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92), фаговый дисплей (Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54) или Т-клеточный дисплей (Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84). В некоторых вариантах осуществления, дисплейные подходы включают конструирование или модификацию известного исходного или эталонного TCR. Например, в некоторых случаях, дикий тип TCR может применяться в качестве шаблона для получения мутагенизированных TCR, в которых один или более остатков CDR мутированы, и выбраны мутанты с желаемым измененным свойством, таким как более высокая аффинность для желаемого антигена-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, пептиды полипептида-мишени для применения в получении или создании TCR, представляющего интерес, известны или могут быть легко идентифицированы. В некоторых вариантах осуществления, пептиды, подходящие для применения в создании TCR или антигенсвязывающих частей, могут быть определены на основе присутствия HLA-ограниченного мотива в полипептиде-мишени, представляющем интерес, таком как полипептид-мишень, описанный ниже. В некоторых вариантах осуществления, пептиды идентифицируют с применением доступных компьютерных моделей прогнозирования. В некоторых вариантах осуществления, для прогнозирования сайтов связывания MHC класса I, такие модели включают, но не ограничены ими, 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, MHC-ограниченным эпитопом является HLA-A0201, который экспрессирован у приблизительно 39-46% всех уроженцев Кавказа, и поэтому представляет собой подходящий выбор MHC антигена для применения в получении TCR или другой связывающей MHC-пептид молекулы.

HLA-A0201-связывающие мотивы и сайты расщепления для протеасом и иммунных протеасом с применением моделей компьютерного прогнозирования известны. Для прогнозирования сайтов связывания MHC класса I, такие модели включают, но не ограничены ими, ProPred1 (более подробно описанные у 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)

В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающая часть может быть рекомбинантно полученным природным белком или его мутированной формой, в котором было изменено одно или более свойств, таких как характеристики связывания. В некоторых вариантах осуществления, TCR может быть получен из одного из множества видов животных, таких как человек, мышь, крыса или другое млекопитающее. TCR может быть фиксирован на клетке или иметь растворимую форму. В некоторых вариантах осуществления, для целей представленных способов, TCR имеет фиксированную на клетке форму, экспрессированную на поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления, TCR является полноразмерным TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR является антигенсвязывающей частью. В некоторых вариантах осуществления, TCR является димерным TCR (dTCR). В некоторых вариантах осуществления, TCR является одноцепочечным TCR (sc-TCR). В некоторых вариантах осуществления, dTCR или scTCR имеют структуры, описанные в WO 03/020763, WO 04/033685, WO2011/044186.

В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит последовательность, соответствующую трансмембранной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит последовательность, соответствующую цитоплазматическим последовательностям. В некоторых вариантах осуществления, TCR способен образовывать TCR комплекс с CD3. В некоторых вариантах осуществления, любые TCR, включая dTCR или scTCR, могут быть связаны с сигнальными доменами, которые дают активный TCR на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, TCR экспрессирован на поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления, dTCR содержит первый полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области α цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей последовательности внеклеточной константой области α цепи TCR, и второй полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области β цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей последовательности внеклеточной константой области β цепи TCR, где первый и второй полипептиды связаны дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления, связь может соответствовать нативной межцепочечной дисульфидной связи, присутствующей в нативных димерных αβ TCR. В некоторых вариантах осуществления, межцепочечные дисульфидные связи не присутствуют в нативном TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или более цистеинов могут быть введены в константную область внеклеточных последовательностей dTCR в полипептидной паре. В некоторых случаях, и нативная и не нативная дисульфидная связь может быть желательной. В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит трансмембранную последовательность для прикрепления к мембране.

В некоторых вариантах осуществления, dTCR содержит TCR α цепь, содержащую вариабельный α домен, константный α домен и первый мотив димеризации,

присоединенный к С-концу константного α домена, и TCR β цепь, содержащую вариабельный β домен, константный β домен и первый мотив димеризации, присоединенный к С-концу константного β домена, где первый и второй мотивы димеризации легко взаимодействуют с образованием ковалентной связи между аминокислотой в первом мотиве димеризации и аминокислотой во втором мотиве димеризации, связывая TCR α цепь и TCR β цепь вместе.

В некоторых вариантах осуществления, TCR является scTCR. Обычно scTCR может быть создан с применением известных способов. См., например, Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. and Plückthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (USA) 90 3830 (1993); опубликованные международные PCT №№ WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; и Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит введенную не нативную дисульфидную межцепочечную связь для того, чтобы способствовать ассоциации TCR цепей (см., например, опубликованную международную PCT № WO 03/020763). В некоторых вариантах осуществления, scTCR является не связанным дисульфидом усеченным TCR, в котором гетерологичные лейциновые «молнии» слиты с С-концами, что способствует ассоциации цепи (см., например, опубликованную международную PCT № WO99/60120). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит TCRα вариабельный домен, ковалентно связанный с TCRβ вариабельным доменом через пептидный линкер (см., например, опубликованную международную PCT № WO99/18129).

В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый сегмент, составленный из аминокислотной последовательности, соответствующей вариабельной области α цепи TCR, второй сегмент, составленный из аминокислотной последовательности, соответствующей последовательности вариабельной области β цепи TCR, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей последовательности внеклеточного константного домена β цепи TCR, и линкерную последовательность, связывающую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый сегмент, составленный из последовательности вариабельной области α цепи, слитой с N-концом последовательности внеклеточного константного домена α цепи, и второй сегмент, составленный последовательностью вариабельной области β цепи слитой с N-концом последовательности β цепи внеклеточной константной и трансмембранной последовательности, и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый сегмент, составленный последовательностью вариабельной области β цепи TCR, слитой с N-концом последовательности внеклеточного константного домена β цепи, и второй сегмент, составленный последовательностью вариабельной области α цепи, слитой с N-

концом последовательности α цепи внеклеточной константной трансмембранной последовательности, и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую C-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

В некоторых вариантах осуществления, линкером scTCRs, который связывает первый и второй TCR сегменты, может быть любой линкер, способный образовывать одну цепь полипептида, сохраняя специфичность связывания TCR. В некоторых вариантах осуществления, линкерная последовательность, например, может иметь формулу -P-AA-P-, где P является пролином и AA является аминокислотной последовательностью, где аминокислотами являются глицин и серин. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй сегменты спаривают так, чтобы последовательности вариабельной области были ориентированы для такого связывания. Следовательно, в некоторых случаях, линкер имеет достаточную длину для образования расстояния между C-концом первого сегмента и N-концом второго сегмента или наоборот, но не слишком длинным для того, чтобы блокировать или снижать связывание scTCR с лигандом-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, линкер может содержать от или от примерно 10 до 45 аминокислот, например, 10-30 аминокислот или 26-41 аминокислотных остатков, например 29, 30, 31 или 32 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет формулу -PGGG-$(SGGGG)_5$-P-, где P является пролином, G является глицином и S является серином (SEQ ID NO:22). В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет последовательность GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO:23)

В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, связывающую остаток иммуноглобулиновой области константного домена α цепи с остатком иммуноглобулиновой области константного домена β цепи. В некоторых вариантах осуществления, межцепочечная дисульфидная связь в нативном TCR не присутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или более цистеинов могут быть введены в последовательности внеклеточной константной области первого и второго сегментов scTCR полипептида. В некоторых случаях, и нативная и не нативная дисульфидная связь может быть желательной.

В некоторых вариантах осуществления dTCR или scTCR, содержащих введенные межцепочечные дисульфидные связи, нативные дисульфидные связи не присутствуют. В некоторых вариантах осуществления, один или более нативных цистеинов, образующих нативные межцепочечные дисульфидные связи, заменены на другой остаток, такой как серин или аланин. В некоторых вариантах осуществления, введенная дисульфидная связь может быть образована мутацией не-цистеиновых остатков на первом и втором сегментах до цистеина. Типовые не нативные дисульфидные связи TCR описаны в опубликованной международной PCT № WO2006/000830.

В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует аффинность с равновесной связывающей константой для антигена-мишени от или от примерно 10-5 и 10-12 M и все индивидуальные значения и диапазоны настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, антигеном-

мишенью является комплекс MHC-пептид или лиганд.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, такие как α и β цепи, могут быть амплифицированы PCR, клонированием или другими подходящими средствами, и клонированы в подходящий вектор или векторы экспрессии. Вектором экспрессии может быть любой рекомбинантный вектор экспрессии и может применяться для трансформации или трансфицирования любому подходящему хозяину. Подходящие векторы включают такие, которые созданы для размножения и размножения или для экспрессии, или для обоих, такие как плазмиды и вирусы.

В некоторых вариантах осуществления, вектором может быть вектор серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), серии pET (Novagen, Madison, Wis.), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) или серии pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). В некоторых случаях, также могут применяться векторы на основе бактериофагов, такие как λG10, λGT11, λZapII (Stratagene), λEMBL4 и λNM1149. В некоторых вариантах осуществления, растительные векторы экспрессии могут применяться и включают pBI01, pBI101,2, pBI101,3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В некоторых вариантах осуществления, животные векторы экспрессии включают pEUK-Cl, pMAM и pMAMneo (Clontech). В некоторых вариантах осуществления, используют вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены с применением стандартных методов рекомбинантной ДНК. В некоторых вариантах осуществления, векторы могут содержать регуляторные последовательности, такие как для инициации транскрипции и трансляции и стоп-кодоны, которые являются специфическими к типу хозяина (например, бактериям, грибам, растениям или животным) в который должен быть введен вектор, подходящим образом и принимая во внимание, является ли вектор ДНК- или РНК-основанным. В некоторых вариантах осуществления, вектор может содержать не нативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей TCR или антигенсвязывающую часть (или другую MHC-пептид-связывающую молекулу). В некоторых вариантах осуществления, промотором может быть не вирусный или вирусный промотор, такой как цитомегаловирусный (CMV) промотор, SV40 промотор, RSV промотор и промотор, найденный в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мыши. Другие известные промоторы также рассматриваются.

В некоторых вариантах осуществления, для создания вектора, кодирующего TCR, α и β цепи PCR амплифицируют из общей кДНК, выделенной из клона Т-клеток, экспрессирующих TCR, представляющий интерес, и клонируют в вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, α и β цепи клонированы в тот же вектор. В некоторых вариантах осуществления, α и β цепи клонируют в разные векторы. В некоторых вариантах осуществления, созданные α и β цепи вводят в ретровирусный, например лентивирусный, вектор. Генетически сконструированные клетки и способы

получения клеток

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы включают введение субъекту, имеющему заболевание или состояние, клеток, экспрессирующих рекомбинантный антигенный рецептор. Разные способы введения генетически сконструированных компонентов, например, рекомбинантных рецепторов, например, CAR или TCR, хорошо известны и могут применяться с представленными способами и композициями. Типовые способы включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, например, через вирусную, например, ретровирусную или лентивирусную, трансдукцию, транспозоны и электропорацию.

Клетки, экспрессирующие рецепторы и вводимые представленными способами, включают сконструированные клетки. Генетическое конструирование в общем включает введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный или сконструированный компонент, в композицию, содержащую клетки, например, ретровирусной трансдукцией, трансфекцией или трансформацией.

3. Химерные рецепторы ауто-антитела (CAAR)

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные рецепторы, экспрессированные сконструированными клетками, применяемыми в связи с представленными способами, применениями, изделиями производства и композициями, включают химерные рецепторы аутоантитела (CAAR). В некоторых вариантах осуществления, CAAR является специфическим для аутоантитело. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CAAR, такая как Т-клетка, сконструированная для экспрессии CAAR, может применяться для специфического связывания и уничтожения аутоантитело-экспрессирующих клеток, но не нормального антитела, экспрессирующего клетки. В некоторых вариантах осуществления, CAAR-экспрессирующие клетки могут применяться для лечения аутоиммунного заболевания, ассоциированного с экспрессией эндоантигенов, таких как аутоиммунные заболевания. В некоторых вариантах осуществления, CAAR-экспрессирующие клетки могут таргетировать В-клетки, которые в конечном счете продуцируют аутоантитела и демонстрируют аутоантитела на их клеточных поверхностях, отмечая такие и В-клетки как заболевание-специфические мишени для терапевтического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления, CAAR-экспрессирующие клетки могут применяться для эффективного таргетирования и уничтожения патогенных В клеток при аутоиммунных заболеваниях через таргетирование вызывающих заболевание В-клеток с применением рецептора антиген-специфического химерного аутоантитела. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является CAAR, такой, как описан в публикации заявки на патент США № US 2017/0051035.

В некоторых вариантах осуществления, CAAR содержит аутоантитело-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления,

внутриклеточный сигнальный домен является или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен вызывать первичный сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область содержит вторичную или костимулирующую сигнальную область (вторичные внутриклеточные сигнальные области).

В некоторых вариантах осуществления, аутоантитело-связывающий домен содержит аутоантиген или его фрагмент. Выбор аутоантигена может зависеть от типа таргетируемого аутоантитела. Например, аутоантиген может быть выбран, так как он распознает аутоантитело на клетке-мишени, такой как В-клетка, ассоциированной с конкретным болезненным состоянием, например аутоиммунным заболеванием, таким как аутоантитело-опосредованное заболевание. В некоторых вариантах осуществления, аутоиммунное заболевание включает обыкновенную пузырчатку (PV). Типовые аутоантигены включают десмоглеин 1 (Dsg1) и Dsg3.

4. Мультитаргетирование

В некоторых вариантах осуществления, клетки, применяемые в связи с представленными способами, применениями, изделиями производства и композициями, включают клетки, применяющие многоцелевые стратегии, такие как экспрессия двух или более генетически сконструированных рецепторов на клетке, каждый из которых распознает один и тот же или разные антигены и обычно, каждый из которых включает разные внутриклеточные сигнальные компоненты. Такие многоцелевые стратегии описаны, например, в публикации международной патентной заявки №: WO 2014055668 A1 (описывающей комбинации активирующих и костимулирующих CAR, например, таргетирование двух разных антигенов, присутствующих индивидуально на нецелевых, например, нормальных клетках, но присутствуют вместе только на клетках лечимого заболевания или состояния) и у Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (2013) (описывающем клетки, экспрессирующие активирующие и ингибирующие CAR, в которых активирующие CAR связываются с одним антигеном, экспрессированным и на нормальных или не болезненных клетках, и на клетках лечимого заболевания или состояния, и ингибирующие CAR связываются с другим антигеном, экспрессированным только на нормальных клетках или клетках, которые не желательно лечить).

Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки включают рецептор, экспрессирующий первый генетически сконструированный антигенный рецептор (например, CAR или TCR), который способен индуцировать активирующий или стимулирующий сигнал в клетку, в общем, при специфическом связывании с антигеном, распознаваемым первым рецептором, например, первым антигеном. В некоторых вариантах осуществления, клетка дополнительно включает второй генетически сконструированный антигенный рецептор (например, CAR или TCR), например, химерный костимулирующий рецептор, который способен индуцировать

костимулирующий сигнал в иммунную клетку, в общем, при специфическом связывании со вторым антигеном, распознаваемым вторым рецептором. В некоторых вариантах осуществления, первый антиген и второй антиген являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления, первый антиген и второй антиген являются разными.

В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй генетически сконструированный антигенный рецептор (например, CAR или TCR) способен индуцировать сигнал активации в клетку. В некоторых вариантах осуществления, рецептор включает внутриклеточный сигнальный компонент, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы. В некоторых вариантах осуществления, активация, индуцированная первым рецептором, включает трансдукцию сигнала или изменение экспрессии белка в клетке, что приводит в инициированию иммунного ответа, такого как фосфорилирование ITAM и/или инициация ITAM-опосредованного каскада трансдукции сигнала, образование иммунологического синапса и/или группирование молекул рядом со связанным рецептором (например CD4 или CD8, и т.д.), активация одного или более факторов транскрипции, таких как NF-κB и/или AP-1, и/или индуцирование экспрессии генов факторов, таких как цитокины, пролиферации, и/или выживания.

В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй рецептор включает внутриклеточные сигнальные домены или области костимулирующих рецепторов, таких как CD28, CD137 (4-1BB), OX40 и/или ICOS. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй рецептор включает внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора, которые являются разными. В одном варианте осуществления, первый рецептор содержит CD28 костимулирующую сигнальную область, и второй рецептор содержит 4-1BB костимулирующую сигнальную область, или наоборот.

В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй рецептор включает и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM или ITAM-подобный мотивы, и внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора.

В некоторых вариантах осуществления, первый рецептор содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы, и второй рецептор содержит внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора. Костимулирующий сигнал в комбинации с сигналом активации, вызванном в той же клетке, вызывает иммунный ответ, такой как стабильный и продолжительный иммунный ответ, такой как повышенная экспрессия гена, секретирование цитокинов и других факторов, и опосредованные Т-клетками эффекторные функции, такие как уничтожение клетки.

В некоторых вариантах осуществления, ни лигирование только первого рецептора, ни лигирование только второго рецептора не вызывает стабильный иммунный ответ. В некоторых аспектах, если лигирован только один рецептор, клетки лишаются толерантности или становятся неотвечаемыми на антиген или ингибируются, и/или в них не вызывается пролиферация или секретирование факторов или не осуществляются

эффекторные функции. В некоторых таких вариантах осуществления, однако, если лигируется множество рецепторов, однако, когда множество рецепторов лигируется, например, при встрече с клеткой, экспрессирующей первый и второй антигены, достигается желаемый ответ, такой как полная иммунная активация или стимулирование, например, на что указывает секреция одного или более цитокинов, пролиферация, жизнестойкость, и/или осуществление иммунной эффекторной функции, такой как цитотоксическое уничтожение клеток-мишеней.

В некоторых вариантах осуществления, два рецептора вызывают, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал к клетке, так, что связывание одного из рецепторов с его антигеном активирует клетку или вызывает ответ, но связывание вторым ингибирующим рецептором или его антигеном вызывает сигнал, который подавляет или снижает ответ. Примеры включают комбинации активирующих CAR и ингибирующих CAR или iCAR. Может применяться такая стратегия, например, при которой активирующий CAR связывает антиген, экспрессированный при заболевании и состоянии, но который также экспрессирован на нормальных клетках, и ингибирующий рецептор связывается с отдельным антигеном, который экспрессирован на нормальной клетке, но не на клетках заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления, многоцелевую стратегию применяют в случае, когда антиген, ассоциированный с конкретным заболеванием или состоянием, экспрессирован на не болезненной клетке и/или экспрессирован на самих сконструированных клетках, либо временно (например, при стимулировании в сочетании с генетическим конструированием), либо постоянно. В таких случаях, требуя лигирования двух отдельных и индивидуально специфических антигенных рецепторов, можно улучшить специфичность, селективность и/или эффективность.

В некоторых вариантах осуществления, множество антигенов, например, первый и второй антигены экспрессированы на таргетной клетке, ткани или заболевании, такой как раковая клетка. В некоторых аспектах, клеткой, тканью, заболеванием или состоянием является клетка множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления, один или более из множества антигенов в общем также экспрессируется на клетке, которую нежелательно таргетировать клеточной терапией, такой как нормальная или не болезненная клетка или ткань, и/или сама сконструированная клетка. В таких случаях, требуя лигирования двух отдельных и индивидуально специфических антигенных рецепторов, можно улучшить специфичность, селективность и/или эффективность.

B. Нуклеиновые кислоты, векторы и способы генетического конструирования

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, клетки популяции обогащенных CD57- Т-клеток, генетически сконструированы для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, конструирование проводят введением одного или более полинуклеотидов, которые кодируют рекомбинантный рецептор или его части или компоненты. Также представлены полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантный рецептор, и векторы или конструкции,

содержащие такие нуклеиновые кислоты и/или полинуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, содержит, по меньшей мере, один промотор, который функционально связан 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, например, для инициации транскрипции и трансляции и стоп-кодоны, которые являются специфическими к типу хозяина (например, бактериям, грибам, растениям или животным) в который должен быть введен вектор, подходящим образом и принимая во внимание, является ли вектор ДНК- или РНК-основанным. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид может содержать регуляторные/контрольные элементы, такие как промотор, энхансер, интрон, сигнал полиаденилирвоания, консенсусная последовательность Козака, внутренние участи посадки рибосомы (IRES), 2A последовательности и акцептор или донор сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид может содержать не нативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей рекомбинантный рецептор и/или один или более дополнительных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления, промотор выбирают из РНК pol I, pol II или pol III промотора. В некоторых вариантах осуществления, промотор распознается РНК полимеразой II (например, CMV, SV40 ранней областью или основным поздним промотором аденовируса). В другом варианте осуществления, промотор распознается РНК полимеразой III (например, U6 или H1 промотором). В некоторых вариантах осуществления, промотором может быть не вирусный промотор или вирусный промотор, такой как цитомегаловирусный (CMV) промотор, SV40 промотор, RSV промотор и промотор, найденный в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мышей. Другие известные промоторы также могут рассматриваться.

В некоторых вариантах осуществления, промотор является или содержит конститутивный промотор. Типовые конститутивные промоторы включают, например, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор Убиквитина C человека (UBC), промотор фактора элонгации 1α человека (EF1α), промотор фосфоглицераткиназы 1 мыши 1 (PGK) и промотор β-Актина курицы, сопряженный с CMV ранним энхансером (CAGG). В некоторых вариантах осуществления, конститутивным промотором является синтетический или модифицированный промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор является или содержит MND промотор, синтетический промотор, который содержит U3 область модифицированного MoMuLV LTR с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы (см. Challita et al. (1995) J. Virol. 69(2):748-755). В некоторых вариантах осуществления, промотором является ткань-специфический промотор. В другом варианте осуществления, промотором является вирусный промотор.

В другом варианте осуществления, промотором является не вирусный промотор. В некоторых вариантах осуществления, типовые промоторы могут включать, но не ограничены ими, промотор фактора элонгации 1 альфа человека (EF1α) или его модифицированную форму, или MND промотор.

В другом варианте осуществления, промотором является регулированный промотор (например, индуцируемый промотор). В некоторых вариантах осуществления, промотором является индуцируемый промотор или репрессируемый промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор содержит последовательность Lac оператора, последовательность тетрациклинового оператора, последовательность галактозного оператора или последовательность доксициклинового оператора или ее аналог, или способен связываться или распознаваться Lac репрессором или тетрациклиновым репрессором или их аналогом. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид не включает регуляторный элемент, например промотор.

В некоторых случаях, последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая рекомбинантный рецептор, содержит сигнальную последовательность, которая кодирует сигнальный пептид. В некоторых аспектах, сигнальная последовательность может кодировать сигнальный пептид, полученный из нативного полипептида. В других аспектах, сигнальная последовательность может кодировать гетерологичный или не нативный сигнальный пептид, такой как типовой сигнальный пептид GMCSFR альфа цепи, указанной в SEQ ID NO:25 и кодированный нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:24. В некоторых случаях, последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая рекомбинантный рецептор, например, химерный антигенный рецептор (CAR), содержит сигнальную последовательность, которая кодирует сигнальный пептид. Не ограничивающие типовые сигнальные пептиды включают, например, сигнальный пептид GMCSFR альфа цепи, указанной в SEQ ID NO: 25 и кодированный нуклеотидной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:24, или сигнальный пептид CD8 альфа, указанный в SEQ ID NO:26.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую один или более дополнительных полипептидов, например, один или более маркеров и/или одну или более эффекторных молекул. В некоторых вариантах осуществления, один или более маркеров включают маркер трансдукции, суррогатный маркер и/или маркер селектирования. Введенные дополнительные последовательности нуклеиновых кислот, например, кодирующие один или более дополнительных полипептидов, включают последовательности нуклеиновых кислот, которые могут улучшать эффективность терапии, например, способствуя жизнеспособности и/или функционированию перенесенных клеток; последовательности нуклеиновых кислот для получения генетического маркера для селектирования и/или оценки клеток, например, оценки in vivo выживаемости или локализации; последовательности нуклеиновых кислот для улучшения безопасности, например, делая клетки чувствительными к отрицательному селектированию in vivo, как описано у 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 применение бифункциональных селектируемых гибридных генов, полученных из доминантного положительного селектируемого маркера с отрицательным селектируемым маркером, и патент США № 6,040,177.

В некоторых вариантах осуществления, маркером является маркер трансдукции или суррогатный маркер. Маркер трансдукции или суррогатный маркер может применяться для определения клеток которые были введены с полинуклеотидом, например, полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, маркер трансдукции может означать или подтверждать модификацию клетки. В некоторых вариантах осуществления, суррогатным маркером является белок, который сделан, чтобы совместно экспрессироваться на клеточной поверхности с рекомбинантным рецептором, например CAR. В конкретных вариантах осуществления, такой суррогатный маркер является поверхностным белком, который был модифицирован, чтобы иметь незначительную или не иметь активность. В некоторых вариантах осуществления, суррогатный маркер кодирован на том же полинуклеотиде, который кодирует рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связана с последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей маркер, необязательно разделенные внутренним участком посадки рибосомы (IRES), или нуклеиновой кислотой, кодирующей самоотщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, такой как 2A последовательность. Внешние маркерные гены могут, в некоторых случаях, применяться в связи со сконструированными клетками, чтобы позволить определение или селектирование клеток и, в некоторых случаях, также способствовать исключению клеток и/или самоубийству клеток.

Типовые суррогатные маркеры могут включать усеченные формы полипептидов клеточной поверхности, такие как усеченные формы, которые не являются функциональными и не трансдуцируют или не способны трансдуцировать сигнал или сигнал, обычно трансдуцируемый полноразмерной формой полипептида клеточной поверхности, и/или не может или не способен интернализироваться. Типовые усеченные полипептиды клеточной поверхности включают усеченные формы факторов роста или других рецепторов, такие как усеченный рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (tHER2), усеченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR, типовая tEGFR последовательность указана в SEQ ID NO:7 ли 16) или простат-специфический мембранный антиген (PSMA) или его модифицированную форму, например, усеченный PSMA (tPSMA). В некоторых аспектах, tEGFR может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимаб (Erbitux®) или другим терапевтическим анти-EGFR антителом или связывающей молекулой, который может применяться для идентификации или селектирования клеток, которые были сконструированы с tEGFR конструкцией и кодированы экзогенным белком, и/или для исключения или отделения клеток,

экспрессирующих кодированный экзогенный белок. См. патент США № 8,802,374 и Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434). В некоторых аспектах, маркер, *например,* суррогатный маркер, включает весь или часть (*например*, усеченную форму) CD34, NGFR, CD19 или усеченный CD19, например, усеченный не человеческий CD19. Типовой полипептид для усеченного EGFR (*например,* tEGFR) содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 7 или 16, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к SEQ ID NO: 7 или 16.

В некоторых вариантах осуществления, маркер является или содержит определяемый белок, такой как флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как супер-складчатый 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 варианты видов, мономерные варианты кодон-оптимизированные, стабилизированные и/или улучшенные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления, маркером является или содержит фермент, такой как люцифераза, ген lacZ из E. coli, щелочная фосфатаза, секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Примеры светоизлучающих репортерных генов включают люциферазу (luc), β-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), β-глюкуронидазу (GUS) или их варианты. В некоторых аспектах, экспрессия фермента может быть определена путем добавления субстрата, который может быть обнаружен по экспрессии и функциональной активности фермента.

В некоторых вариантах осуществления, маркером является собой маркер селектирования. В некоторых вариантах осуществления, маркер селектирования является или содержит полипептид, который придает резистентность экзогенным агентам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления, маркером селектирования является ген резистентности к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления, маркером селектирования является ген резистентности к антибиотику, придающий резистентность к антибиотику клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, маркер селектирования является или содержит ген резистентности к Пуромицину, ген резистентности к Гигромицину, ген резистентности к Бластицидину, ген резистентности к Неомицину, ген резистентности к Генетицину или ген резистентности к Зеоуину или их модифицированные формы.

Любой из рекомбинантных рецепторов и/или дополнительных полипептидов, описанных в настоящем документе, может быть кодирован одним или более полинуклеотидами, содержащими одну или более последовательностей нуклеиновых

кислот, кодирующих рекомбинантный рецептор, в любых комбинациях, ориентации или расположении. Например, один, два, три или более полинуклеотидов могут кодировать один, два, три или более разных полипептидов, например, рекомбинантные рецепторы или их части или компоненты, и/или один или более дополнительных полипептидов, например, маркер и/или эффекторную молекулу. В некоторых вариантах осуществления, один полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую рекомбинантный рецептор, например, CAR, или его часть или компоненты, и последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую один или более дополнительных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления, один вектор или конструкция содержит последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую рекомбинантный рецептор, например, CAR, или его часть или компоненты, и отдельный вектор или конструкция содержит последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую один или более дополнительных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая рекомбинантный рецептор, и последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая один или более дополнительных полипептидов, функционально связаны с двумя разными промоторами. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, присутствует перед нуклеиновой кислотой, кодирующей один или более дополнительных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, присутствует после нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более дополнительных полипептидов.

В определенных случаях, один полинуклеотид содержит последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие две или более разных полипептидных цепей, например, рекомбинантный рецептор и один или более дополнительных полипептидов, например, маркер и/или эффекторную молекулу. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие две или более разных полипептидных цепей, например, рекомбинантный рецептор один или более дополнительных полипептидов, присутствуют в двух разных полинуклеотидах. Например, два разных полинуклеотида представлены, и каждый может быть индивидуально перенесен или введен в клетку для экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие маркер, и последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие рекомбинантный рецептор, присутствуют или вставлены в разных локациях в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие маркер, и последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие рекомбинантный рецептор, функционально связаны с двумя разными промоторами.

В некоторых вариантах осуществления, таких как те, где полинуклеотид содержит первую и вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности, кодирующие каждую из различных цепей полипептида, могут быть функционально связаны с промотором, которые могут быть одинаковыми или разными. В

некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты может содержать промотор, который управляет экспрессией двух или более разных полипептидных цепей. В некоторых вариантах осуществления такие молекулы нуклеиновой кислоты могут быть мультицистронными (бицистронными или трицистронными, см. *например*, патент США № 6,060,273). В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие рекомбинантный рецептор, и последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие один или более дополнительных полипептидов, функционально связаны с одним и тем же промотором и необязательно разделены внутренним участком посадки рибосомы (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, такой как элемент 2A. Например, типовой маркер и, необязательно, последовательность проскока рибосомы, может быть любой, как описано в публикации PCT № WO2014031687.

В некоторых вариантах осуществления, единицы транскрипции могут быть сконструированы как бицистронная единица, содержащая IRES, которая позволяет коэкспрессировать генные продукты (*например*, кодирующие рекомбинантный рецептор и дополнительный полипептид) посредством сообщения от одного промотора. Альтернативно, в некоторых случаях, один промотор может направлять экспрессию РНК, которая содержит в одной открытой рамке считывания (ORF) два или три гена (например, кодирующих маркер и кодирующих рекомбинантный рецептор), отделенные друг от друга последовательностями, кодирующими саморасщепляющийся пептид (например, последовательностями 2A) или сайт распознавания протеазы (например, фурин).

Таким образом, ORF кодирует один полипептид, который либо во время (в случае 2A), либо после трансляции превращается в отдельные белки. В некоторых случаях, пептид, такой как T2A, может привести к тому, что рибосома пропустит (проскок рибосомы) синтез пептидной связи на C-конце элемента 2A, что приведет к разделению между концом последовательности 2A и следующим пептидом ниже (см., например, de Felipe, Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) и de Felipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)). Известны разные элементы 2A. Примеры 2A последовательностей, которые могут применяться в способах и системах, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения, 2A последовательности из вируса ящура (F2A, *например*, SEQ ID NO: 21), вируса ринита A лошадей (E2A, *например*, SEQ ID NO: 20), вируса Thosea asigna (T2A, *например*, SEQ ID NO: 6 или 17) и тешовируса-1 свиней (P2A, *например*, SEQ ID NO: 18 или 19) как описано в публикации патенте США № 20070116690.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор и/или дополнительный полипептид, содержится в векторе или может быть клонирован в один или более векторов. В некоторых вариантах осуществления, один или более векторов можно использовать для трансформации или трансфекции клетки-хозяина, например, клетки для конструирования. Типовые векторы включают векторы, созданные для введения, размножения и размножения, или для экспрессии, или того и другого, такие как плазмиды и вирусные векторы. В некоторых

аспектах, вектором является вектор экспрессии, например, рекомбинантный вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены с применением стандартных методов рекомбинантной ДНК.

В некоторых вариантах осуществления, вектором может быть вектор серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), серии pET (Novagen, Madison, Wis.), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) или серии pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). В некоторых случаях, также могут применяться векторы на основе бактериофагов, такие как λG10, λGT11, λZapII (Stratagene), λEMBL4 и λNM1149. В некоторых вариантах осуществления, растительные векторы экспрессии могут применяться и включают pBI01, pBI101,2, pBI101,3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В некоторых вариантах осуществления, животные векторы экспрессии включают pEUK-Cl, pMAM и pMAMneo (Clontech).

В некоторых вариантах осуществления, вектором является вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор и/или дополнительные полипептиды, вводят в клетку через ретровирусный или лентивирусный векторы или через транспозоны (см., например, Baum et al. (2006) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 13:1050-1063; Frecha et al. (2010) Molecular Therapy 18:1748-1757; и Hackett et al. (2010) Molecular Therapy 18:674-683).

В некоторых вариантах осуществления, один или более полинуклеотидов вводят в клетки с применением рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления, один или более полинуклеотидов вводят в Т-клетку с применением рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10,1038/gt,2014,25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557).

В некоторых вариантах осуществления, вектором является ретровирусный вектор. В некоторых аспектах, ретровирусный вектор имеет последовательность длинного концевого повтора (LTR), например, ретровирусный вектор, полученный из вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мышей (MESV), вируса стволовых клеток мышей (MSCV), вируса некроза селезенки (SFFV) или аденоассоциированного вируса (AAV). Большинство ретровирусных векторов получают из ретровирусов мышей. В некоторых вариантах осуществления, ретровирусы включают те, которые получены из любого источника клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы обычно амфотропны, что означает, что они способны инфицировать клетки-хозяева нескольких видов, включая человека. В одном варианте осуществления, экспрессируемый ген заменяет

ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (например, патенты США №№ 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; 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).

Способы лентивирусной трансдукции известны. Типовые способы описаны в, например, Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeyen et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; и Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор и/или один или более дополнительных полипептидов, вводят в популяцию, содержащую культивированные клетки, например, ретровирусной трансдукцией, трансфекцией или трансформацией.

В некоторых вариантах осуществления, один или более полинуклеотидов вводят в Т-клетку с применением 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-клетку через транспозицию (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 экспрессирования генетического материала, например, полинуклеотидов и/или векторов, в иммунные клетки включают трансфекцию фосфата кальция (например, как описано в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York. N.Y.), слияние протопластов, катионную липосома-опосредованную трансфекцию; усиленную частицами вольфрама бомбардировку микрочастицами (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); и совместную преципитацию ДНК с фосфатом стронция (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987) другие подходы, описанные в, например, публикации международной патентной заявки WO2014055668 и патенте США № 7,446,190.

В некоторых вариантах осуществления один или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих рекомбинантный рецептор и/или дополнительные полипептиды, могут быть введены в клетки, например, Т-клетки, либо во время, либо после размножения. Такое введение полинуклеотидов или векторов можно проводить с любым подходящим ретровирусным вектором, например. Полученные генетически сконструированные клетки затем могут быть освобождены от первоначального стимула (например, анти-CD3/анти-CD28 стимула) и затем стимулированы вторым типом стимула (например, через de novo введенный рекомбинантный рецептор). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме пептида/MHC молекулы, когнатного (перекрестно-связывающего) лиганда генетически введенного рецептора (например, природного антигена и/или лиганда CAR) или любого лиганда (такого как антитело), который напрямую связывается в рамке нового рецептора (например, распознавая

константные области в рецепторе). См., например, Cheadle et al, “Chimeric Antigen Receptors for T-Cells 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).

В некоторых случаях может использоваться вектор, который не требует активации клеток, например Т-клеток. В некоторых таких случаях, клетки могут быть селектированы и/или трансдуцированы до активации. Таким образом, клетки могут быть сконструированы до или после культивирования клеток и, в некоторых случаях, в то же время или в течение, по меньшей мере, части культивирования.

C. Клетки и получение клеток для генетического конструирования

В некоторых вариантах осуществления, представлены сконструированные клетки, например, генетически сконструированные или модифицированные клетки и способы конструирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, один или более полинуклеотидов, например, кодирующих рекомбинантный рецептор и/или дополнительные полипептиды, такие как любые описанные в настоящем документе, вводят в одну клетку для конструирования. В некоторых аспектах, полинуклеотиды и/или их части являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма или клетки, который, например, обычно не обнаруживается в сконструированной клетке и/или организме, от которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновых кислот не существуют в природе, например, последовательности нуклеиновых кислот не найдены в природе или модифицированы из последовательностей нуклеиновых кислот, найденных в природе, включают те, которые содержат химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих разные домены из множества разных типов клеток.

Клетки в общем являются эукариотическими клетками, такими как клетки млекопитающих, и обычно являются клетками человека. В некоторых вариантах осуществления, клетки, полученные из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, являются клетками иммунной системы, такими как клетки врожденного или адаптивного иммунитета, *например*, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, обычно Т-клетки и/или NK-клетки. Другие типовые клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Клетки обычно являются первичными клетками, такими как клетки, выделенные непосредственно от субъекта и/или выделенные от субъекта и замороженные. В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одно или более подмножеств Т-клеток или других типов клеток, таких как целые Т-клеточные популяции, CD4+ клетки, CD8+ клетки и их субпопуляции, такие как клетки, определяемые функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом для дифференциации, размножения, рециркуляции, локализацией и/или жизнестойкостью, антиген-специфичностью, типом антигенного рецептора,

присутствия в конкретном органе или компартменте, профилем секреции маркера или цитокина и/или степенью дифференциации. Что касается субъекта, подлежащего лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. В число способов входят готовые способы. В некоторых аспектах, например, для готовых технологий, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, такими как стволовые клетки, такие как iPSC. В некоторых вариантах осуществления, способы включают выделение клеток из субъекта, подготовку, обработку, культивирование и/или конструирование и повторное введение их тому же субъекту до или после криоконсервации.

Подтипы и субпопуляции Т-клеток и/или CD4+ и/или CD8+ Т-клеток включают наивные Т-клетки (T_N), эффекторные Т-клетки (T_{EFF}), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}), центральные Т-клетки памяти (T_{CM}), эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}) или терминально-дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, инфильтрующие опухоль лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, мукозальные инвариантные Т-клетки (MAIT), существующие в природе и адаптивные регуляторные Т-клетки (Treg), хелперные Т-клетки, такие как TH1 клетки, TH2 клетки, TH3 клетки, TH17 клетки, TH9 клетки, TH22 клетки, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, клетками являются естественные клетки-киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления клетками являются моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одну или более нуклеиновых кислот, введенных посредством генетического конструирования, и тем самым экспрессируют рекомбинантные или генетически сконструированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма, или клетки, которые, например, обычно не обнаруживаются в сконструированной клетке и/или организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты не существуют в природе, например, нуклеиновая кислота не встречается в природе, включая таковые, содержащие химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующие различные домены из множества различных типов клеток.

В некоторых вариантах осуществления, получение сконструированных клеток включает одну или более стадий культивирования и/или получения. Клетки для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансгенный рецептор, такой как CAR, могут быть выделены из образца, такого как биологический образец, например, полученный или полученный от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъект, из которого выделены клетки, является субъектом, страдающим заболеванием или состоянием, или нуждающимся в клеточной терапии, или которому будет вводиться клеточная терапия.

Субъектом, в некоторых вариантах осуществления, является человек, нуждающийся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которого клетки выделяют, обрабатывают и/или конструируют.

Соответственно, клетки в некоторых вариантах осуществления являются первичными клетками, например, первичными клетками человека. Образцы включают образцы ткани, жидкости и другие образцы, взятые непосредственно у субъекта, а также образцы, полученные в результате одного или более этапов обработки, таких как разделение, центрифугирование, генетическое конструирование (например, трансдукция вирусным вектором), промывание и/или инкубирование. Биологическим образцом может быть образец, полученный непосредственно из биологического источника, или образец, который подвергся обработке. Биологические образцы включают, но не ограничены ими, биологические жидкости, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая обработанные образцы, полученные из них.

В некоторых аспектах образец, из которого получены или выделены клетки, является кровью или образцом, полученным из крови, или полученным из продукта афереза или лейкафереза. Примеры образцов включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, лимфоидную ткань, связанную со слизистой оболочкой, лимфоидную ткань, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почку, поджелудочную железу, грудь, кость, простату, шейку матки, яички, яичники, миндалины или другой орган и/или клетки, полученные из них. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, например, адоптивную клеточную терапию, образцы из аутологичных и аллогенных источников.

В некоторых вариантах осуществления, клетки получены из клеточных линий, например, Т-клеточных линий. В некоторых вариантах осуществления, клетки получены из ксеногенного источника, например, от мыши, крысы, примата, не являющегося человеком, и свиньи.

В некоторых вариантах осуществления, выделение клеток включает одну или более стадий получения и/или разделения клеток не на основе аффинности. В некоторых примерах, клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или более реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащают желаемыми компонентами, лизируют или удаляют чувствительные к определенным реагентам клетки. В некоторых примерах клетки разделяют на основе одного или более свойств, таких как плотность, адгезионные свойства, размер, чувствительность и/или резистентность к определенным компонентам.

В некоторых примерах, клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, аферезом или лейкаферезом. В некоторых аспектах, образцы содержат лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие белые клетки крови, красные клетки крови и/или тромбоциты, и в

некоторых аспектах, содержат клетки, отличные от красных клеток крови и тромбоцитов.

В некоторых вариантах осуществления клетки крови, полученные от субъекта, промывают, например, для удаления фракций плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления, клетки промывают солевым раствор с фосфатным буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления, в промывочном растворе отсутствуют кальций и/или магний и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах, стадию промывки осуществляют на полуавтоматической «проточной» центрифуге (например, клеточном процессоре Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах, стадию промывки осуществляют тангенциальной проточной фильтрацией (TFF) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления, клетки ресуспендируют во множестве биосовместимых буферов после промывания, таких как, например, не содержащий Ca^{++}/Mg^{++} PBS. В некоторых вариантах осуществления, компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают способы разделения клеток на основе плотности, такие как получение белых клеток крови из периферической крови путем лизирования красных клеток крови и центрифугирования в градиенте Перколла или Фиколла.

В некоторых вариантах осуществления, способы выделения включают разделение различных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или более специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностный белок, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления, может быть использован любой известный способ разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления, разделением является разделение на основе аффинности или иммуноаффинности. Например, выделение в некоторых аспектах включает разделение клеток и клеточной популяции на основе экспрессии или уровня экспрессии одного или более маркеров на клетках, обычно маркеров клеточной поверхности, например, с помощью инкубирования с антителом или партнером связывания, который специфически связывается с такими маркерами, с последующими обычно стадиями промывки и отделения клеток, связанных с антителом или партнером связывания, от клеток, не связанных с антителом или партнером связывания.

Такие стадии разделения могут быть основаны на положительном селектировании, в котором клетки, связанные с реагентами, сохраняют для дальнейшего использования, и/или отрицательного селектирования, в котором клетки, не связанные с антителом или партнером связывания, сохраняют. В некоторых примерах, обе фракции сохраняют для дальнейшего использования. В некоторых аспектах, отрицательное селектирование может быть особенно полезно там, где не доступно антитело, специфически идентифицирующее тип клетки в гетерогенной популяции, так что разделение лучше всего проводить на основе маркеров, экспрессированных клетками, отличными от желаемой популяции.

Разделение не обязательно должно приводить к 100% обогащению или удалению определенной клеточной популяции или клеток, экспрессирующих определенный маркер. Например, положительное селектирование или обогащение для клеток определенного типа, таких, которые экспрессируют маркер, относится к увеличению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Аналогичным образом, отрицательное селектирование, удаление или истощение клеток определенного типа, например, экспрессирующих маркер, относится к уменьшению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток.

В некоторых примерах выполняют несколько раундов стадий разделения, где положительно или отрицательно выбранные фракции с одной стадии подвергают другой стадии разделения, например, последующему положительному или отрицательному селектированию. В некоторых примерах, одна стадия разделения может истощить клетки, экспрессирующие несколько маркеров одновременно, например, путем инкубирования клеток с множеством антител или партнеров связывания, каждый из которых специфичен для маркера, направленного на отрицательное селектирование. Аналогичным образом, несколько типов клеток могут быть одновременно положительно селектированы инкубированием клеток с множеством антител или партнеров связывания, экспрессированных на различных типах клеток.

Например, в некоторых аспектах, специфические субпопуляции Т-клеток, такие как клетки, положительные или экспрессирующие один или более поверхностных маркеров, например, $CD28^+$, $CD62L^+$, $CCR7^+$, $CD27^+$, $CD127^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RA^+$ и/или $CD45RO^+$ Т-клетки, выделяют методами положительного или отрицательного селектирования.

Например, $CD3^+$, $CD28^+$ Т-клетки могут быть положительно селектированы с применением анти-CD3/анти-CD28 конъюгированных магнитных гранул (например, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 размножитесь Т-клеток).

В некоторых вариантах осуществления, выделение проводят обогащением для конкретной клеточной популяции через положительное селектирование или истощением конкретной клеточной популяции через отрицательное селектирование. В некоторых вариантах осуществления, положительное или отрицательное селектирование проводят через инкубирование клеток с одним или более антителами или другим связывающим агентом, который специфически связывается с одним или более поверхностными маркерами, экспрессированными или экспрессированными (маркер$^+$) на относительно высоком уровне (маркер^{выс}) на положительно или отрицательно селектированных клетках, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки отделяют от образца PBMC отрицательным селектированием маркеров, экспрессированных на не Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты ли другие белые клетки крови, такие как CD14. В некоторых аспектах, стадию $CD4^+$ или $CD8^+$ селектирования применяют для отделения $CD4^+$

хелперных и $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток. Такие $CD4^+$ и $CD8^+$ популяции могут быть далее отсортированы на субпопуляции положительным или отрицательным селектированием для маркеров, экспрессированных или экспрессированных до относительно высокой степени на одной или более субпопуляциях наивных, памяти и/или эффекторных Т-клетках.

В некоторых вариантах осуществления, $CD8^+$ клетки дополнительно обогащают или истощают наивными, центральными памяти, эффекторными памяти и/или центральными стволовыми памяти клетками, например, положительным или отрицательным селектированием на основе поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления, обогащение для центральных Т-клеток памяти (T_{CM}) проводят для повышения эффективности, например, для улучшения долговременного выживания, размножения и/или энграфтмента после введения, что, в некоторых аспектах, особенно устойчиво в таких субпопуляциях. См. Terakuraet al. (2012) Blood,1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В некоторых вариантах осуществления, комбинирование T_{CM}-обогащенных $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток дополнительно улучшает эффективность.

В вариантах осуществления, Т-клетки памяти присутствуют в обоих $CD62L^+$ и $CD62L^-$ подмножествах $CD8^+$ лимфоцитов периферической крови. PBMC могут быть обогащены или истощены $CD62L^-CD8^+$ и/или $CD62L^+CD8^+$ фракциями, например, с применением анти-CD8 и анти-CD62L антител.

В некоторых вариантах осуществления, обогащение для центральных Т-клеток памяти (T_{CM}) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; в некоторых аспектах, оно основано на отрицательном селектировании для клеток, экспрессирующих или высоко экспрессирующих CD45RA и/или гранзим В. В некоторых вариантах осуществления, обогащение для центральных Т-клеток памяти (T_{CM}) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD27 и/или CD127. В некоторых вариантах осуществления, обогащение для центральных Т-клеток памяти (T_{CM}) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD62L, CCR7, CD28 и/или CD27. В некоторых вариантах осуществления, обогащение для центральных Т-клеток памяти (T_{CM}) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CCR7, CD28 и/или CD27. В некоторых вариантах осуществления, обогащение для центральных Т-клеток памяти (T_{CM}) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD28 и CD27. В некоторых аспектах, выделение $CD8^+$ популяций обогащенных T_{CM} клеток проводят истощением клеток, экспрессирующих CD4, CD14, CD45RA, и положительным селектированием или обогащением для клеток, экспрессирующих CD62L. В некоторых аспектах, выделение $CD8^+$ популяции обогащенных T_{CM} клеток проводят истощением клеток, экспрессирующих CD4, CD14, CD45RA и положительным селектированием или обогащением для клеток, экспрессирующих CD27 и CD28. В одном аспекте, обогащение

для центральных Т-клеток памяти (T_{CM}) проводят, начиная с отрицательной фракции клеток, селектированных на основе CD4 экспрессии, которую подвергают отрицательному селектированию на основе экспрессии CD14 и CD45RA и положительному селектированию на основе CD62L. Такое селектирование в некоторых аспектах проводят одновременно, и в других аспектах проводят последовательно, в любом порядке. В некоторых аспектах, ту же стадию селектирования на основе экспрессии CD4 применяют при приготовлении $CD8^+$ клеточной популяции или субпопуляции, также применяют для создания $CD4^+$ клеточной популяции или субпопуляции, так, что обе, положительная и отрицательная фракции после разделения на основе CD4, сохраняют и применяют на последующих стадиях способов, необязательно, после одной или более дополнительных стадий положительного или отрицательного селектирования.

В конкретном примере, образец PBMC или другой образец белой клетки крови подвергают селектированию $CD4^+$ клеток, где обе, отрицательную и положительную фракции, сохраняют. Отрицательную фракцию затем подвергают отрицательному селектированию на основе экспрессии CD14 и CD45RA или CD19 и положительному селектированию на основе маркера, характерного для центральной Т-клетки памяти, такой как CD62L или CCR7, где положительное и отрицательное селектирование проводят в любом порядке.

$CD4^+$ Т хелперные клетки сортируют на наивные, центральные памяти и эффекторные клетки через идентификацию клеточных популяций, которые имеют антигены клеточной поверхности. $CD4^+$ лимфоциты могут быть получены стандартными способами. В некоторых вариантах осуществления, наивные $CD4^+$ Т лимфоциты являются $CD45RO^-$, $CD45RA^+$, $CD62L^+$, $CD4^+$ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, центральные $CD4^+$ клетки памяти являются $CD62L^+$ и $CD45RO^+$. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные $CD4^+$ клетки являются $CD62L^-$ и $CD45RO^-$.

В одном примере, для обогащения для $CD4^+$ клеток отрицательным селектированием, коктейль моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления, антитело или партнер связывания связывается с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитная гранула или парамагнитная гранула, чтобы обеспечить разделение клеток для положительного и/или отрицательного селектирования. Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки и клеточные популяции разделяют или выделяют с использованием методов иммуномагнитного (или аффинномагнитного) разделения (рассматриваемых в Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

В некоторых аспектах, разделяемый образец или популяцию клеток инкубируют с мелким, намагничивающимся или магниточувствительным материалом, таким как магниточувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные гранулы (например, такие как Dynabeads или гранулы MACS). Магниточувствительный материал,

например, частицы, в общем, прямо или косвенно связан с партнером связывания, например, антителом, которое специфически связывается с молекулой, например, поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые желательно отделить, например, которые желательно отрицательно или положительно селектировать.

В некоторых вариантах осуществления, магнитные частицы или гранулы содержат магниточувствительный материал, связанный со специфическим участником связывания, таким как антитело или другой партнер связывания. Существует множество хорошо известных магниточувствительных материалов, используемых в методах магнитного разделения. Подходящие магнитные частицы включают такие, которые описаны в Molday, патенте США № 4,452,773 и описании европейского патента EP 452342 B, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки. Другими примерами являются частицы коллоидного размера, такие как описаны в Owen патенте США № 4,795,698 и Liberti et al., патенте США № 5,200,084.

Инкубирование в общем проводят в условиях, при которых антитела или партнеры связывания или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты, специфически связываются с такими антителами или партнерами связывания, которые прикрепляются к магнитным частицам или гранулам, специфически связанным с молекулами клеточной поверхности, если они присутствуют на клетках в образце.

В некоторых аспектах образец помещают в магнитное поле, и те клетки, которые имеют магниточувствительные или намагничивающиеся частицы, прикрепленные к ним, будут притягиваться к магниту и отделяться от не меченых клеток. Для положительного селектирования, клетки, которые притягиваются к магниту, сохраняют; при отрицательном селектировании клетки, которые не притягиваются (не меченые клетки), сохраняют. В некоторых аспектах, комбинацию положительного и отрицательного селектирования проводят во время одной и той же стадии селектирования, при котором положительные и отрицательные фракции сохраняют и затем обрабатывают или подвергают дальнейшим стадиям разделения.

В некоторых вариантах осуществления, магниточувствительные частицы покрыты первичными антителами или другими партнерами связывания, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления, магнитные частицы прикреплены к клеткам через покрытие первичными антителами, специфическими к одному или более маркерам. В некоторых вариантах осуществления, клетки, а не гранулы, метят первичным антителом или партнером связывания, и затем добавляют покрытые клеточным типом специфическим к покрытым вторичным антителом или другим партнером связывания (например, стрептавидином) магнитные частицы. В некоторых вариантах осуществления, покрытые стрептавидином магнитные частицы используют вместе с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

В некоторых вариантах осуществления, чувствительные к магниту частицы

остаются прикрепленными к клеткам, которые впоследствии должны быть инкубированы, культивированы и/или сконструированы; в некоторых аспектах, частицы остаются прикрепленными к клеткам для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления, намагничиваемые или магниточувствительные частицы удаляют из клеток. Способы удаления намагничиваемых частиц из клеток известны и включают, например, использование конкурирующих не меченых антител и намагничиваемых частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами. В некоторых вариантах осуществления, намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

В некоторых вариантах осуществления, селектирование на основе аффинности осуществляют с помощью активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Системы активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) способны с высокой чистотой селектировать клетки, имеющие прикрепленные к ним намагниченные частицы. В некоторых вариантах осуществления, MACS работает в режиме, в котором не целевые и целевые виды последовательно элюируют после воздействия внешнего магнитного поля. То есть, клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, в то время как не привязанные частицы элюируются. Затем, после завершения такой первой стадии элюирования, частицы, которые были захвачены магнитным полем и не могли быть элюированы, освобождают некоторым образом, так что они могут быть элюированы и восстановлены. В некоторых вариантах осуществления, нецелевые клетки метят и истощают из гетерогенных популяций клеток.

В некоторых вариантах осуществления, выделение или разделение проводят с использованием системы, устройства или аппарата, которые выполняют одну или более стадий способов выделения, приготовления клетка, разделения, обработки, инкубирования, культивирования и/или составления. В некоторых аспектах, систему используют для выполнения каждой из этих стадий в закрытой или стерильной среде, например, для минимизации ошибок, действий пользователя и/или загрязнения. В одном примере, системой является система, описанная в публикации международной патентной заявки № WO2009/072003 или US 20110003380.

В некоторых вариантах осуществления, система или аппарат выполняет одну или более, например, все стадии выделения, обработки, конструирования и составления в интегрированной или автономной системе и/или автоматизированном или программируемом режиме. В некоторых аспектах, система или аппарат включает компьютер и/или компьютерную программу, взаимодействующую с системой или аппаратом, которая позволяет пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или настраивать различные аспекты стадий обработки, выделения, конструирования и составления.

В некоторых аспектах, разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматического разделения клеток на клиническом уровне в закрытой и стерильной системе. Компоненты могут включать

встроенный микрокомпьютер, блок магнитного разделения, перистальтический насос и различные пережимные клапаны. Встроенный компьютер в некоторых аспектах контролирует все компоненты инструмента и направляет систему на выполнение повторяющихся процедур в стандартизированной последовательности. Блок магнитного разделения в некоторых аспектах включает подвижный постоянный магнит и держатель для селектирующей колонки. Перистальтический насос контролирует скорость потока по всему комплекту трубок и, вместе с пережимными клапанами, обеспечивает контролируемый поток буфера через систему и непрерывную суспензию клеток.

В некоторых аспектах, система CliniMACS использует намагничиваемые частицы, связанные с антителом, которые поставляются в стерильном апирогенном растворе. В некоторых вариантах осуществления, после мечения клеток магнитными частицами клетки промывают для удаления избыточных частиц. Пакет для приготовления клеток затем соединяют с комплектом трубок, который, в свою очередь, соединяют с пакетом, содержащим буфер, и пакетом для сбора клеток. Комплект трубок состоит из предварительно собранных стерильных трубок, включая предварительную колонку и разделительную колонку, и предназначен только для одноразового использования. После запуска программы разделения система автоматически наносит образец клеток на разделительную колонку. Меченые клетки остаются в колонке, тогда как не меченые клетки удаляют с помощью ряда стадий промывания. В некоторых вариантах осуществления, клеточные популяции для использования со способами, описанными в настоящем документе, является не меченной и не сохраняются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, клеточные популяции для использования со способами, описанными в настоящем документе, являются меченными и сохраняются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, клеточные популяции для использования со способами, описанными в настоящем документе, элюируют из колонки после удаления магнитного поля и получают в пакете для сбора клеток.

В некоторых вариантах осуществления, разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy в некоторых аспектах оборудована блоком обработки клеток, который позволяет проводить автоматическую промывку и фракционирование клеток центрифугированием. Система CliniMACS Prodigy также может включать бортовую камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, которое определяет оптимальную конечную точку фракционирования клеток через распознавание макроскопических слоев источника клеточного продукта. Например, периферическую кровь автоматически разделяют на эритроциты, белые клетки крови и слои плазмы. Система CliniMACS Prodigy также может включать интегрированную камеру для культивирования клеток, которая выполняет протоколы культивирования клеток, такие как, например, дифференциация и размножение клеток, загрузка антигена и длительное культивирование клеток. Входные порты позволяют стерильно удалять и пополнять среду, и клетки можно контролировать с применением встроенного микроскопа. См., например, Klebanoff et al. (2012) J

Immunother. 35(9): 651-660, Terakuraet al. (2012) Blood,1:72-82 и Wang et al. (2012) J Immunother.35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления, клеточную популяцию, описанную в настоящем документе, получают и обогащают (или истощают) с применением проточной цитометрии, при которой клетки, окрашенные для множества маркеров клеточной поверхности, переносятся в жидком потоке. В некоторых вариантах осуществления, клеточную популяцию, описанную в настоящем документе, получают и обогащают (или истощают) с применением (FACS)-сортинга в препаративном масштабе. В некоторых вариантах осуществления, клеточную популяцию, описанную в настоящем документе, получают и обогащают (или истощают) с применением чипов микроэлектромеханических систем (MEMS) в комбинации с системой обнаружения на основе FACS (см., например, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; и Godin et al. (2008) J Biophoton. 1(5):355-376). В обоих случаях, клетки могут быть мечены множеством маркеров, позволяющих выделение хорошо охарактеризованного подмножества Т-клеток с высокой чистотой.

В некоторых вариантах осуществления, антитела или партнеры связывания помечены одним или более определяемыми маркерами, чтобы облегчить разделение для положительного и/или отрицательного селектирования. Например, разделение может быть основано на связывании с флуоресцентно мечеными антителами. В некоторых примерах, разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров связывания, специфических для одного или более маркеров клеточной поверхности, проводят в жидком потоке, например, с помощью флуоресцентного сортинга (FACS), включая препаративный масштаб (FACS) и/или чипов микроэлектромеханических систем (МЭМС), например, в комбинации с проточно-цитометрической системой определения. Такие способы позволяют проводить положительное и отрицательное селектирование на основе множества маркеров одновременно.

В некоторых вариантах осуществления, способы получения включают стадии замораживания, например, криоконсервации, клеток до или после выделения, инкубирования и/или конструирования. В некоторых вариантах осуществления, стадия замораживания и последующего размораживания удаляет гранулоциты и, до некоторой степени, моноциты в клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, клетки суспендируют в замораживающем растворе, например, после стадии промывания для удаления плазмы и тромбоцитов. Может использоваться любой из множества известных замораживающих растворов и параметров, в некоторых аспектах. Один из примеров включает использование PBS, содержащего 20% ДМСО и 8% сывороточного альбумина человека (HSA), или другую подходящую среду для замораживания клеток. Затем ее разводят 1:1 так, чтобы конечная концентрация ДМСО и HSA составляла 10% и 4% соответственно. Клетки затем замораживают до -80°С со скоростью 1° в минуту и хранят в паровой фазе жидкого азота в резервуаре для хранения.

В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют и/или культивируют до

или в связи с генетическим конструированием. Стадии инкубирования могут включать культивирование, культивирование, стимулирование, активацию и/или размножение. Инкубирование и/или конструирование может быть проведено в культуральном сосуде, таком как блок, камера, лунка, колонка, пробирка, комплект трубок, клапан, флакон, чашка для культивирования, пакет или другой контейнер для культивирования или культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, популяции или клетки инкубируют в условиях стимулирования или в присутствии стимулирующего агента. Такие условия включают условия, предназначенные для индуцирования пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, имитации воздействия антигена и/или подготовки клеток для генетического конструирования, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора.

Условия могут включать одну или более конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание диоксида углерода, время, агенты, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры связывания, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления, условия стимулирования или агенты включают один или более агент, например, лиганд, который способен активировать внутриклеточный сигнальный домен TCR комплекса. В некоторых аспектах, агент включает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке. Такие агенты могут включать антитела, специфические для TCR, например анти-CD3. В некоторых вариантах осуществления, условия стимулирования включают один или более агентов, например лигандов, которые способны стимулировать костимулирующий рецептор, например, анти-CD28. В некоторых вариантах осуществления, такие агенты и/или лиганды могут быть связаны с твердой подложкой, такой как гранула, и/или одним или более цитокинами. Необязательно, способ размножения может дополнительно включать стадию добавления анти-CD3 и/или анти CD28 антитела к культуральной среде (например, в концентрации, по меньшей мере, примерно 0,5 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления, агенты стимулирования включают IL-2, IL-15 и/или IL-7. В некоторых аспектах, концентрация IL-2 составляет, по меньшей мере, примерно 10 ед/мл.

В некоторых аспектах, инкубирование проводят в соответствии с методами, описанным в патенте США № 6,040,177, Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakuraet al. (2012) Blood,1:72-82, и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки размножают добавлением в инициирующую культивирование популяцию питающих клеток, таких как неделящиеся мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), (например, так, чтобы полученная популяция клеток содержала, по меньшей мере, примерно 5, 10, 20 или 40 или более питающих клеток PBMC для каждого Т-лимфоцита в начальной популяции, которая

должна быть размножена); и инкубированием культуры (например, в течение времени, достаточного для увеличения числа Т-клеток). В некоторых аспектах, неделящиеся питающие клетки могут включать гамма-облученные PBMC питательные клетки. В некоторых вариантах осуществления PBMC облучают гамма-лучами в интервале примерно от 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах, питающие клетки добавляют в питательную среду до добавления популяции Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, условия стимулирования включают температуру, подходящую для роста Т-лимфоцитов человека, например, по меньшей мере, примерно 25 градусов Цельсия, в общем, по меньшей мере, примерно 30 градусов и, в общем, точно или примерно 37 градусов Цельсия. Необязательно, инкубирование может дополнительно включать добавление неделящихся EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве питающих клеток. LCL могут быть облучены гамма-лучами в интервале примерно от 6000 до 10000 рад. Питающие клетки LCL в некоторых аспектах представлены в любом подходящем количестве, например, при соотношении питающих клеток LCL к исходным Т-лимфоцитам, по меньшей мере, примерно 10:1.

В вариантах осуществления, антигенспецифические Т-клетки, такие как антигенспецифические CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, получают стимулированием наивных или антигенспецифических Т лимфоцитов с антигеном. Например, антигенспецифические Т-клеточные линии или клоны могут быть созданы до цитомегаловирусных антигенов через выделение Т-клеток у инфицированных субъектов и стимулированием клеток in vitro с тем же антигеном.

V. КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлены терапевтические композиции (например, терапевтические композиции Т-клеток), создаваемые любым производственным процессом, раскрытым в настоящем документе, например, выходные композиции, содержащие сконструированные (экспрессирующие рекомбинантный рецептор) Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлены терапевтические композиции (например, терапевтические композиции Т-клеток), имеющие любой один или более признаков, описанных в настоящем документе, например, в разделе III-F. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, содержащая клетки, сконструированные с рекомбинантным антигенным рецептором, например CAR или TCR, представлена в виде композиции или состава, такого как фармацевтическая композиция или состав. Такие композиции могут применяться в соответствии с представленными способами и/или с представленными изделиями производства или композициями, например, для профилактики или лечения заболеваний, состояний и расстройств, или в способах обнаружения, диагностики и прогнозирования.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая композиция Т-клеток содержит CD4+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, и CD8+ Т-клетки,

экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где, по меньшей мере, 80% от общего количества рецептор+/CD8+ клеток в композиции являются CD57-, и, по меньшей мере, 80% от общего количества рецептора+/CD4+ клеток в композиции являются CD57-. В некоторых вариантах осуществления, терапевтической композицией Т-клеток является такая, в которой, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 99%, примерно 100% или 100% клеток в композиции являются CD4+ Т-клетками и CD8+ Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая композиция Т-клеток включает CD3+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где, по меньшей мере, 80% от общего количества рецептора+/CD3+ клеток в композиции являются CD57-. В некоторых вариантах осуществления, терапевтической композицией Т-клеток является такая, в которой, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 99%, примерно 100% или 100% клеток в композиции являются CD3+ Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая композиция Т-клеток содержит определенное отношение CD4 и CD8 Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, отношение рецептора+/CD4+ Т-клеток к рецептору+/CD8+ Т-клеткам в композиции составляет от примерно 1:3 до примерно 3:1, например, составляет точно или примерно 1:1.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является любой, как описано в разделе IV.A. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор способен связываться с белком-мишенью, который ассоциирован с, является специфическим к и/или экспрессирован на клетке или ткани заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

В некотором варианте осуществления, количество жизнеспособных Т-клеток в представленной терапевтической композиции составляет точно или примерно 10×10^6 клеток и точно или примерно 200×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество жизнеспособных Т-клеток в представленной терапевтической композиции составляет от точно или примерно 10×10^6 клеток до точно или примерно 100×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество жизнеспособных Т-клеток в представленной терапевтической композиции составляет от точно или примерно 10×10^6

клеток до точно или примерно 70×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество жизнеспособных Т-клеток в представленной терапевтической композиции составляет от точно или примерно 10×10^6 клеток до точно или примерно 50×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество жизнеспособных Т-клеток в представленной терапевтической композиции составляет от точно или примерно 50×10^6 клеток до точно или примерно 200×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество жизнеспособных Т-клеток в представленной терапевтической композиции составляет от точно или примерно 50×10^6 клеток до точно или примерно 100×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество жизнеспособных Т-клеток в представленной терапевтической композиции составляет от точно или примерно 50×10^6 клеток до точно или примерно 70×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество жизнеспособных Т-клеток в представленной терапевтической композиции составляет от точно или примерно 70×10^6 клеток до точно или примерно 200×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество жизнеспособных Т-клеток в представленной терапевтической композиции составляет от точно или примерно 70×10^6 клеток до точно или примерно 100×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество жизнеспособных Т-клеток в представленной терапевтической композиции составляет от точно или примерно 100×10^6 клеток до точно или примерно 200×10^6 клеток. В некоторых аспектах, объем композиции составляет от 1,0 мл до 10 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составляет точно или примерно 2 мл, точно или примерно 3 мл, точно или примерно 4 мл, точно или примерно 5 мл, точно или примерно 6 мл, точно или примерно 7 мл, точно или примерно 8 мл, точно или примерно 9 мл или точно или примерно 10 мл или любое значения между любыми из вышеперечисленных.

Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который имеет такую форму, чтобы обеспечить эффективность биологической активности активного ингредиента, содержащегося в нем, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому вводят состав.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтического состава, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничен ими, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

В некоторых аспектах, выбор носителя частично определяется конкретной клеткой или агентом и/или способом введения. Соответственно, существует множество подходящих составов. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. В некоторых аспектах используют смесь двух или более консервантов. Консерванты или их смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,0001% до примерно 2% от общей массы композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители в целом нетоксичны для реципиентов в

используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничены ими: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлические комплексы (например, Zn-протеиновые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

Буферные агенты в некоторых аспектах включены в композиции. Подходящие буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах используют смесь двух или более буферных агентов. Буферный агент или их смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,001% до примерно 4% от общей массы композиции. Способы получения фармацевтических композиций для введения известны. Типовые способы описаны более подробно в, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

Состав или композиция может также содержать более чем один активный ингредиент, полезный для конкретного показания, заболевания или состояния, которое предотвращается или лечится клетками или агентами, когда соответствующие активности не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Такие активные ингредиенты обычно присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для предполагаемой цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно включает другие фармацевтически активные агенты или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические агенты, например, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.д. В некоторых вариантах осуществления агенты или клетки вводят в форме соли, например, фармацевтически приемлемой соли. Подходящие фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли включают соли, полученные из минеральных кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, и органических кислот, таких как винная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, фумаровая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная и арилсульфоновая кислоты, например, п-толуолсульфоновая кислота.

Фармацевтическая композиция в некоторых вариантах осуществления содержит

агенты или клетки в количествах, эффективных для лечения или профилактики заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическую или профилактическую эффективность в некоторых вариантах осуществления отслеживают путем периодической оценки субъектов, получающих лечение. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако могут быть полезны и другие схемы дозирования, и они могут быть определены. Желаемая доза может быть доставлена однократным болюсным введением композиции, многократным болюсным введением композиции или непрерывным инфузионным введением композиции.

Агенты или клетки могут быть введены любыми подходящими способами, например, болюсной инфузией, инъекцией, например, внутривенными или подкожными инъекциями, внутриглазной инъекцией, периокулярной инъекцией, субретинальной инъекцией, интравитреальной инъекцией, транс-септальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, интрахориоидальной инъекцией, внутрикамерной инъекцией, субконъюнктивной инъекцией, субконъюнтивальной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перибульбарной инъекцией или доставкой в заднюю околосклеральную область. В некоторых вариантах осуществления их вводят парентерально, внутрилегочно и интраназально и, если желательно для местного лечения, внутриочагово. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления, данную дозу вводят однократным болюсным введением клеток или агента. В некоторых вариантах осуществления, ее вводят множественным болюсным введением клеток или агента, например, в течение периода не более 3 дней или непрерывным инфузионным введением клеток или агента.

Для профилактики или лечения заболевания, подходящая дозировка может зависеть от типа заболевания, которое подлежит лечению, типа агента или агентов, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, независимо от того, вводят ли агент или клетки в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни субъекта и ответа на агент или клетки, и на усмотрение лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления, композиции вводят субъекту за один раз или в течение серии курсов лечения.

Клетки или агенты могут быть введены с использованием стандартных методов введения, составов и/или устройств. Представлены составы и устройства, такие как шприцы и флаконы, для хранения и введения композиций. Что касается клеток, введение может быть аутологичным или гетерологичным. Например, иммунореактивные клетки или предшественники могут быть получены от одного субъекта и введены тому же субъекту или другому совместимому субъекту. Иммунореактивные клетки, полученные из периферической крови, или их потомство (например, полученное in vivo, ex vivo или in vitro) могут быть введены местной инъекцией, включая катетерное введение, системную

инъекцию, локализованную инъекцию, внутривенную инъекцию или парентеральное введение. При введении терапевтической композиции (например, фармацевтической композиции, содержащей генетически модифицированные иммунореактивные клетки или агент, который лечит или ослабляет симптомы нейротоксичности), она в общем будет составлена в виде стандартной дозированной формы для инъекции (раствора, суспензии, эмульсии).

Составы включают составы для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, легочного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, буккального, сублингвального введения или суппозиторного введения. В некоторых вариантах осуществления, агент или клеточные популяции вводят парентерально. Термин «парентеральный», используемый в настоящем документе, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В некоторых вариантах осуществления, агент или клеточные популяции вводят субъекту с использованием периферической системной доставки путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

Композиции в некоторых вариантах осуществления представлены в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые в некоторых аспектах могут быть забуференными до выбранного pH. Жидкие препараты обычно легче приготовить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Дополнительно, жидкие композиции несколько удобнее вводить, особенно инъекцией. Вязкие композиции, с другой стороны, могут быть составлены в соответствующем диапазоне вязкости для обеспечения более длительных периодов контакта с определенными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут быть растворителем или диспергирующей средой, содержащей, например, воду, солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены введением агента или клеток в растворитель, такой как смесь с подходящим носителем, разбавителем или эксципиентом, такой как стерильная вода, солевой раствор, глюкоза, декстроза или подобные.

Составы, используемые для введения in vivo, обычно являются стерильными. Стерильность может быть легко достигнута, например, фильтрацией через стерильные фильтрующие мембраны.

VI. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

В настоящем документе представлены способы лечения, например, включающие введение любых из сконструированных клеток или композиций, содержащих сконструированные клетки, описанных в настоящем документе. В некоторых аспектах также представлены способы введения любых из сконструированных клеток или композиций, содержащих сконструированные клетки, описанных в настоящем документе,

субъекту, например субъекту, который страдает заболеванием или расстройством. В некоторых аспектах также представлены способы применения любых сконструированных клеток или композиций, содержащих сконструированные клетки, описанных в настоящем документе, для лечения заболевания или расстройства. В некоторых аспектах также представлено применение любых сконструированных клеток или композиций, содержащих сконструированные клетки, описанных в настоящем документе, для производства лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства. В некоторых аспектах также представлены любые сконструированные клетки или композиции, содержащие сконструированные клетки, описанные в настоящем документе, для использования при лечении заболевания или расстройства или для введения субъекту, имеющего заболевание или расстройство.

Способы введения клеток адоптивной клеточной терапии известны и могут использоваться в связи с представленными способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2003/0170238 от Gruenberg et al; патенте США № 4,690,915 to Rosenberg; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85). См., например, Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338.

В некоторых вариантах осуществления, субъекту, например, субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии заболевания или расстройства, вводят клеточную терапию, имеющую низкое или пониженное количество CD57+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, количество или частоту CD57+ клеток в клеточной терапии измеряют до введения. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия имеет менее чем или менее чем примерно 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1% CD57+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество или частоту CD57+ клеток в клеточной терапии измеряют, и клеточную терапию вводят субъекту, если клеточная терапия имеет менее чем или менее чем примерно 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1% CD57+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия имеет менее чем или менее чем примерно 25% CD57 Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, клеточная терапия имеет менее чем или менее чем примерно 10% CD57 Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия имеет менее чем или менее чем примерно пороговое количество CD57+ Т-клеток.

В конкретных вариантах осуществления, субъекту, например, субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии заболевания или расстройства, вводят клеточную терапию, имеющую низкое или пониженное количество Т-клеток, положительных для CD57 экспрессии, или низкое или пониженное количество признака, ассоциированного с экспрессией CD57. В некоторых вариантах осуществления, признак, ассоциированный с экспрессией CD57, измеряют в клетках клеточной терапии до введения клеточной терапии субъекту. В конкретных вариантах осуществления, признак, ассоциированный с экспрессией CD57, измеряют в клеточной терапии, и клеточную терапию вводят субъекту,

если клеточная терапия имеет менее чем пороговое значение признака, ассоциированного с экспрессией CD57.

В альтернативных вариантах осуществления, пороговым значением является заранее определенное значение. В некоторых вариантах осуществления, пороговое значение определяют экспериментально. В некоторых вариантах осуществления, пороговым значением является среднее, медианное или среднее значение признака, измеренного во множестве клеточных терапий. В некоторых вариантах осуществления, пороговое значение экспериментально получают из измерений множества клеточных терапий, например, эталонных клеточных терапий. В некоторых вариантах осуществления, эталонными клеточными терапиями являются эталонные композиции Т-клеток, например, композиции Т-клеток, включающие Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор. В возможных вариантах осуществления, эталонные композиции Т-клеток, например, Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, измеряют до введения субъектам.

В конкретных вариантах осуществления, эталонные клеточные терапии или эталонные композиции Т-клеток являются композиции клеточной терапии, содержащей Т-клетки, например, включая Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, из группы субъектов, которые продолжили получение клеточной терапии для лечения того же заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления, эталонной клеточной терапией или эталонной композицией Т-клеток являются композиции Т-клеток, которые вводят субъектам, у которых продолжает развиваться частичный ответ или прогрессирующее заболевание.

В некоторых вариантах осуществления, признаком, ассоциированным с экспрессией CD57, является уровень или количество CD57 полипептида, присутствующего в общих Т-клетках, общих CD4+ Т-клетках или общих CD8+ Т-клетках. В конкретных вариантах осуществления, признаком является уровень или количество CD57 полипептида, присутствующего в дозе общих Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, признаком является уровень или количество CD57 полипептида, присутствующего на поверхности общих Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток. В разных вариантах осуществления, признаком является частота, доля или количество CD57+ Т-клеток, CD57+CD4+ Т-клеток или CD57+CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, признаком является уровень или количество CD57 иРНК, присутствующих в дозах Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, признаком является уровень или количество доступности гена, кодирующего CD57 (B3GAT1).

В некоторых вариантах осуществления, признаком, ассоциированным с экспрессией CD57, является уровень или количество CD57 полипептида, присутствующего в общих CD3+ Т-клетках. В конкретных вариантах осуществления, признаком является уровень или количество CD57 полипептида, присутствующего в общей дозе CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, признаком является

уровень или количество CD57 полипептида, присутствующего на поверхности общих CD3+ Т-клеток. В разных вариантах осуществления, признаком является частота, доля или количество CD57+CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, признаком является уровень или количество CD57 иРНК, присутствующих в дозах Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, признаком является уровень или количество доступности гена, кодирующего CD57 (B3GAT1).

В конкретных вариантах осуществления, пороговое значение составляет, составляет примерно или составляет в пределах 75%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% или в пределах менее чем 1% ниже среднего, среднего или медианного измерения признака, ассоциированного с экспрессией CD57 во множестве эталонных клеточных терапий или эталонных композициях Т-клеток. Количество ниже одной, половины, одной трети, одной четвертой, одной пятой, одной шестой, одной восьмой или одной десятой стандартного отклонения менее среднего, среднего или медианного измерения признака. В конкретных вариантах осуществления пороговое значение составляет ниже наименьшего измерения признака, ассоциированного с экспрессией CD57 в композиции из множества эталонных композиций Т-клеток или эталонных клеточных терапий. В некоторых вариантах осуществления, порог находится в пределах или в пределах примерно 50%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% или в пределах менее чем 1% ниже наименьшего измерения признака, измеренного для множества эталонных клеточных терапий или эталонных композиций Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, пороговое значение составляет ниже среднего, медианного или среднего измерения признака, ассоциированного с экспрессией CD57, рассчитанного для частоты в эталонных композициях Т-клеток или эталонных клеточных терапиях. В некоторых вариантах осуществления, пороговое значение является средним, медианным или средним измерением из, из примерно или из, по меньшей мере, 25%, 33%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% измерений, взятых из множества эталонных композиций Т-клеток.

В возможных вариантах осуществления, признак, ассоциирован с экспрессией CD57, измеряют в клеточной терапии до введения клеточной терапии субъекту. В некоторых вариантах осуществления, измерение используют для оценки риска, вероятности или возможности того, что субъект даст полного ответа. В некоторых вариантах осуществления, измерение используют для оценки риска, вероятности или возможности того, что субъект даст частичный ответ или прогрессирующий исход заболевания после введения клеточной терапии. В возможных вариантах осуществления, субъект определяется как имеющий повышенный риск, вероятность или возможность не дать полный ответ после введения клеточной терапии, если значение признака больше порогового значения признака. В некоторых вариантах осуществления, субъект определяется как имеющий повышенный риск, вероятность или возможность дать частичный ответ или прогрессирующее заболевание после введения клеточной терапии, если значение признака больше порогового значения признака. В некоторых вариантах

осуществления, пороговым значением является любое пороговое значение признака, ассоциированного с CD57, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, субъекты, которые считаются имеющими повышенный риск неспособности дать полный ответ после введения клеточной терапии, продолжают давать полный ответ с частотой менее чем или менее чем примерно 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15% 10% или менее чем 10% после введения дозы клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, которые считаются имеющими повышенный риск неспособности дать полный ответ, продолжают давать полный ответ с частотой менее 20% после введения дозы клеточной терапии. В разных вариантах осуществления субъекты, которые считаются имеющими повышенный риск неспособности дать полный ответ, продолжают давать полный ответ с частотой, равной или равной примерно 0% после введения дозы клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъекты, которые считаются имеющими повышенный риск дать частичный ответ или прогрессирующий исход заболевания после введения клеточной терапии, продолжают давать полный ответ с частотой менее чем или менее чем примерно 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15% 10% или менее чем 10% после введения дозы клеточной терапии. В разных вариантах осуществления, субъекты, которые считаются имеющими повышенный риск дать частичный ответ или прогрессирующий исход заболевания, продолжают давать полный ответ с частотой менее чем 20% после введения дозы клеточной терапии. В разных вариантах осуществления, субъекты, которые считаются имеющими повышенный риск дать частичный ответ или прогрессирующий исход заболевания, продолжают давать полный ответ с частотой, составляющей или составляющей примерно 0% после введения дозы клеточной терапии.

В конкретных вариантах осуществления, субъекты, которые считаются имеющими повышенный риск неспособности дать полный ответ, получают повышенную дозу клеточной терапии, например, для улучшения вероятности или возможности того, что субъекты продолжат достигать полного ответа. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, которые считаются имеющими повышенный риск дать частичный ответ или прогрессирующий исход заболевания, получают повышенную дозу клеточной терапии, например, для улучшения вероятности или возможности того, что субъекты продолжат достигать полного ответа.

Заболеванием или состоянием, которое лечат, может быть любое, при котором экспрессия антигена ассоциирована с и/или вовлечены в этиологию болезненного состояния или расстройства, например вызывает, обостряет или иным образом вовлечена в такое заболевание, состояние или расстройство. Типовые заболевания и состояния могут включать заболевания или состояния, ассоциированные со злокачественностью или трансформацией клеток (например, рак), аутоиммунное или воспалительное заболевание или инфекционное заболевание, например, вызванное бактериальным, вирусным или другим патогеном. Типовые антигены, которые включают антигены, ассоциированные с различными заболеваниями и состояниями, которые можно лечить, описаны выше. В

конкретных вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор или трансгенный TCR специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием.

К заболеваниям, состояниям и расстройствам относятся опухоли, включая солидные опухоли, гематологические злокачественные новообразования и меланомы, включая локализованные и метастатические опухоли, инфекционные заболевания, такие как заражение вирусом или другим патогеном, например, HIV, HCV, HBV, CMV, HPV, и паразитарные заболевания и аутоиммунные и воспалительные заболевания. В некоторых вариантах осуществления заболеванием, расстройством или состоянием является опухоль, рак, злокачественное новообразование, новообразование или другое пролиферативное заболевание или расстройство. К таким заболеваниям относятся, но не ограничены ими, лейкоз, лимфома, например, острый миелоидный (или миелогенный) лейкоз (AML), хронический миелоидный (или миелогенный) лейкоз (CML), острый лимфоцитарный (или лимфобластный) лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточный лейкоз (HCL), малая лимфоцитарная лимфома (SLL), мантийноклеточная лимфома (MCL), лимфома маргинальной зоны, лимфома Беркитта, лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALCL), фолликулярная лимфома, рефрактерная фолликулярная лимфома, диффузная B-крупноклеточная лимфома (DLBCL) и множественная миелома (MM). В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или состоянием является злокачественное новообразование B-клеток, выбранное из острого лимфобластного лейкоза (ALL), ALL взрослых, хронического лимфобластного лейкоза (CLL), неходжкинской лимфомы (NHL) и диффузной B-крупноклеточной лимфомы (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или состоянием является NHL, и NHL выбирают из группы, состоящей из агрессивной NHL, диффузной B-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), NOS (впервые диагностированным или трансформированным из вялотекущего), первичной медиастинальной B-крупноклеточной лимфомы (PMBCL), T-клеточной/гистиоцитарной B-крупноклеточной лимфомы (TCHRBCL), лимфомы Беркитта, мантийноклеточной лимфомы (MCL) и/или фолликулярной лимфомы (FL), необязательно, фолликулярной лимфомы степени 3B (FL3B).

В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или состоянием является инфекционное заболевание или состояние, такое как, но не ограниченное ими, вирусные, ретровирусные, бактериальные и протозойные инфекции, иммунодефицит, цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейн-Барр (EBV), аденовирус, BK полиомавирус. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или состоянием является аутоиммунное или воспалительное заболевание или состояние, такое как артрит, например, ревматоидный артрит (RA), диабет I типа, системная красная волчанка (SLE), воспалительное заболевание кишечника, псориаз, склеродермия, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, болезнь Грейвса, болезнь Крона, рассеянный склероз,

астма и/или заболевание или состояние, ассоциированное с трансплантатом.

В некоторых вариантах осуществления, антиген, ассоциированный с заболеванием или расстройством, является или включает αvβ6 интегрин (avb6 интегрин), антиген созревания В-клетки (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), антиген рака яичек, антиген рака/яичек 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, C-C Мотив хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, белок эпидермального фактора роста (EGFR), усеченный белок эпидермального фактора роста (tEGFR), мутация рецептора эпидермального фактора роста III типа (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин B2, эфриновый рецептор A2 (EPHa2), рецептор эстрогена, Fc рецептор подобный 5 (FCRL5; также известный как Fc рецептор гомолог 5 или FCRH5), фетальный ацетилхолиновый рецептор (фетальный AchR), фолатный связывающий белок (FBP), фолатный рецептор альфа, ганглиозид GD2, O-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), сопряженный с G-белком рецептор 5D (GPCR5D), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), erbB димеры, высокомолекулярный меланома-ассоциированный антиген человека (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита B, лейкоцитарный антиген человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарный антиген человека A2 (HLA-A2), IL-22 рецептор альфа (IL-22Rα), IL-13 рецептор альфа 2 (IL-13Rα2), рецептор со встроенным киназным доменом (kdr), легкая цепь каппа, L1 молекула клеточной адгезии (L1-CAM), CE7 эпитоп L1-CAM, член семейства A содержащий богатые лейцином повторы 8 (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), c-Met, цитомегаловирус мыши (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, член D группы 2 натуральных киллеров (NKG2D) лиганды, мелан A (MART-1), нервная молекула клеточной адгезии (NCAM), онкоэмбриональный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), прогестероновый рецептор, простат-специфический антиген, антиген стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфический мембранный антиген (PSMA), орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивин, трофобласт гликопротеина (TPBG также известный как 5T4), опухолеассоциированый гликопротеин 72 (TAG72), тирозиназа-зависимый белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), тирозиназа-зависимый белок 2 (TRP2, также известный как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT) рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR), рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2), опухоль Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфическтй или патоген-экспрессированный антиген или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессированные HIV, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены, таргетированные рецепторами, в некоторых вариантах осуществления, включают

антигены, ассоциированные со злокачественными В-клетками, такие, как любые из множества известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления, антиген является или включает CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b или CD30. В некоторых вариантах осуществления, антиген является или включает патоген-специфический или патоген-экспрессированный антиген, такой как вирусный антиген (например, вирусный антиген из HIV, HCV, HBV), бактериальные антигены и/или паразитарные антигены.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент (*например* scFv или V_H домен) специфически распознает антиген, такой как CD19. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент получен из или является вариантом антитела или антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления, клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, проводят аутологическим переносом, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, который должен получить клеточную терапию, или из образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах, клетки получают от субъекта, например, пациента, нуждающегося в лечении, и клетки, после выделения и обработки, вводят тому же субъекту.

В некоторых вариантах, клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, проводят аллогенной передачей, при которой клетки выделяют и/или иным образом получают из субъекта, отличного от субъекта, который должен получать или который в конечном итоге получает клеточную терапию, 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 генетически идентичны. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй субъекты генетически похожи. В некоторых вариантах осуществления, второй субъект экспрессирует тот же класс HLA или супертип, что и первый субъект.

Клетки могут быть введены любыми подходящими способами, например, болюсной инфузией, инъекцией, например, внутривенными или подкожными инъекциями, внутриглазной инъекцией, периокулярной инъекцией, субретинальной инъекцией, интравитреальной инъекцией, транс-септальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, интрахориоидальной инъекцией, внутрикамерной инъекцией, субконъюнктивной инъекцией, субконъюнтивальной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перибульбарной инъекцией или доставкой в заднюю околосклеральную область. В некоторых вариантах осуществления, их вводят парентерально, внутрилегочно и интраназально и, если желательно для местного лечения, внутрь очага поражения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления, данную дозу вводят клетками однократным болюсным введением клеток. В некоторых вариантах осуществления, их вводят

множественным болюсным введением клеток, например, в течение периода не более 3 дней, или непрерывным инфузионным введением клеток. В некоторых вариантах осуществления, введение дозы клеток или любые дополнительные терапии, например, противолимфомную терапию, интервенционную терапию и/или комбинированную терапию, проводят амбулаторно.

Для профилактики или лечения заболевания подходящая дозировка может зависеть от типа заболевания, которое подлежит лечению, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, от того, вводятся ли клетками в профилактических или терапевтических целях, от предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на клетки, и на усмотрение лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления, композиции и клетки вводят субъекту подходящим образом за один раз или в течение серии курсов лечения.

В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят как часть комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно с, в любом порядке, другим терапевтическим вмешательством, таким как антитело или сконструированная клетка, или рецептор, или агент, такой как цитотоксический или терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами или в связи с другим терапевтическим вмешательством, одновременно или последовательно, в любом порядке. В некоторых контекстах, клетки вводят совместно с другой терапией, достаточно близкой по времени, так что клеточная популяция усиливает эффект одного или более дополнительных терапевтических агентов или наоборот. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят до одного или более дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят после одного или более дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, один или более дополнительных агентов включают цитокин, такой как IL-2, например, для повышения жизнестойкости. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение химиотерапевтического агента.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение химиотерапевтического агента, например, кондиционирующего химиотерапевтического агента, например, для уменьшения опухолевой нагрузки до введения.

Прекондиционирование субъектов иммуноистощающими (например, противолимфомной) терапиями в некоторых аспектах может улучшить эффект адоптивной клеточной терапии (АСТ).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, способы включают введение прекондиционирующего агента, такого как противолимфомного или химиотерапевтического агента, такого как циклофосфамид, флударабин или их комбинации, субъекту до начала клеточной терапии. Например, субъекту вводят прекондиционирующий агент, по меньшей мере, за 2 дня до, например, по меньшей мере, за 3, 4, 5, 6 или 7 дней до начала клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят прекондиционирующий агент не более чем за 7 дней до,

например, не более чем за 6, 5, 4, 3 или 2 дней до начала клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления субъект прекондиционирован циклофосфамидом в дозе от или от примерно 20 мг/кг до 100 мг/кг, например от или примерно 40 мг/кг и 80 мг/кг. В некоторых аспектах, субъект прекондиционирован примерно 60 мг/кг циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид может быть введен в разовой дозе или может быть введен множеством доз, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид вводят один раз в день в течение одного или двух дней. В некоторых вариантах осуществления, где противолимфомный агент содержит циклофосфамид, субъекту вводят в дозе от или от примерно 100 мг/м^2 and 500 мг/м^2, например, от или от примерно 200 мг/м^2 и 400 мг/м^2 или 250 мг/м^2 и 350 мг/м^2, включительно. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 300 мг/м^2 циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид может вводиться в одной дозе или может вводиться множеством доз, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение от 3 до 5 дней. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 300 мг/м^2 циклофосфамида, ежедневно, в течение 3 дней, до начала клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, если противолимфомный агент содержит флударабин, субъекту вводят флударабин в дозе от или от примерно 1 мг/м^2 и 100 мг/м^2, например, от или от примерно 10 мг/м^2 и 75 мг/м^2, 15 мг/м^2 и 50 мг/м^2, 20 мг/м^2 и 40 мг/м^2 или 24 мг/м^2 и 35 мг/м^2, включительно. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 30 мг/м^2 флударабина. В некоторых вариантах осуществления, флударабин может вводиться в одной дозе или может вводиться множеством доз, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, флударабин вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение от 3 до 5 дней. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 30 мг/м^2 флударабина, ежедневно, в течение 3 дней, до начала клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, противолимфомный агент содержит комбинацию агентов, например, комбинацию циклофосфамида и флударабина. Таким образом, комбинация агентов может включать циклофосфамид в любой дозе или при любой схеме введения, такой как описана выше, и флударабин в любой дозе или при любой схеме введения, такой как описана выше. Например, в некоторых аспектах, субъекту вводят 60 мг/кг (~2 г/м^2) циклофосфамида и от 3 до 5 доз 25 мг/м^2 флударабина до первой или последующей дозы.

После введения клеток, биологическую активность сконструированных клеточных популяций, в некоторых вариантах осуществления, измеряют, например, любым из ряда известных способов. Параметры оценки включают специфическое связывание сконструированных или природных Т-клеток или другой иммунной клетки с антигеном, in vivo, например, с помощью визуализации, или ex vivo, например, с помощью ELISA или

проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, способность сконструированных клеток разрушать клетки-мишени может быть измерена с использованием любых подходящих известных способов, таких как анализы цитотоксичности, описанные в, например, Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009) и Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004). В некоторых вариантах осуществления, биологическую активность клеток измеряют анализом экспрессии и/или секреции одного или более цитокинов, таких как CD107a, IFNγ, IL-2 и TNF. В некоторых аспектах, биологическую активность измеряют оценкой клинического результата, такого как уменьшение опухолевой нагрузки или массы.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки дополнительно модифицированы любым количеством способов, так что их терапевтическая или профилактическая эффективность повышается. Например, сконструированный CAR или TCR, экспрессируемый популяцией, может быть конъюгирован, прямо или косвенно, через линкер с таргетной группой. Практика конъюгирования соединений, например CAR или TCR, с таргетными группами известна. См., например, Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 111 (1995) и патент США № 5,087,616.

В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят как часть комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно с, в любом порядке, другим терапевтическим вмешательством, таким как антитело или сконструированная клетка, или рецептор, или агент, такой как цитотоксический или терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими средствами или в связи с другим терапевтическим вмешательством, одновременно или последовательно, в любом порядке. В некоторых контекстах, клетки вводят совместно с другой терапией, достаточно близкой по времени, так что клеточная популяция усиливает эффект одного или более дополнительных терапевтических агентов или наоборот. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят до одного или более дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводятся после одного или более дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, один или более дополнительных агентов включает цитокин, такой как IL-2, например, для повышения жизнестойкости.

A. Дозирование

В некоторых вариантах осуществления, дозу клеток вводят субъектам в соответствии с представленными способами и/или с представленными изделиями производства или композициями. В некоторых вариантах осуществления, размер или время введения дозы определяют в зависимости от конкретного заболевания или состояния у субъекта. В некоторых случаях, размер или время введения дозы для конкретного заболевания с учетом приведенного описания могут быть определены эмпирически.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит от точно или примерно 2×10^5 клеток/кг и точно или примерно 2×10^6 клеток/кг, например, от точно или

примерно 4×10^5 клеток/кг и точно или примерно 1×10^6 клеток/кг или от точно или примерно 6×10^5 клеток/кг и точно или примерно 8×10^5 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит не более 2×10^5 клеток (например, антигенэкспрессирующих, таких как CAR-экспрессирующие клетки) на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, не более чем точно или примерно 3×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 4×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 5×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 6×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 7×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 8×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 9×10^5 клеток/кг, не более чем точно или примерно 1×10^6 клеток/кг или не более чем точно или примерно 2×10^6 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или точно или примерно 2×10^5 клеток (например, антигенэкспрессирующих, таких как CAR-экспрессирующие клетки) на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно 3×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно 4×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или точно или примерно 5×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или точно или примерно 6×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно 7×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или точно или примерно 8×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно 9×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно 1×10^6 клеток/кг или по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно 2×10^6 клеток/кг.

В некоторых вариантах осуществления, клетки или отдельные популяции подтипов клеток вводят субъекту в диапазоне от примерно одного миллиона до примерно 100 миллиардов клеток, и/или такое количество клеток на килограмм массы тела, например, например, от 1 миллиона до примерно 50 миллиардов клеток (например, примерно 5 миллионов клеток, 10 миллионов клеток, примерно 15 миллионов клеток, примерно 20 миллионов клеток, примерно 25 миллионов клеток, примерно 500 миллионов клеток, примерно 1 миллиарда клеток, примерно 5 миллиардов клеток, примерно 20 миллиардов клеток, примерно 30 миллиардов клеток, примерно 40 миллиардов клеток или интервал, определенный любыми двумя из вышеописанных диапазонов), например, от примерно 10 миллионов до примерно 100 миллиардов клеток (например, примерно 20 миллионов клеток, примерно 30 миллионов клеток, примерно 40 миллионов клеток, примерно 60 миллионов клеток, примерно 70 миллионов клеток, примерно 80 миллионов клеток, примерно 90 миллионов клеток, примерно 10 миллиардов клеток, примерно 25 миллиардов клеток, примерно 50 миллиардов клеток, примерно 75 миллиардов клеток, примерно 90 миллиардов клеток или интервал, определенный любыми двумя из вышеописанных диапазонов) и в некоторых случаях от примерно 100 миллионов клеток до примерно 50 миллиардов клеток (например, примерно 120 миллионов клеток,

примерно 250 миллионов клеток, примерно 350 миллионов клеток, примерно 450 миллионов клеток, примерно 650 миллионов клеток, примерно 800 миллионов клеток, примерно 900 миллионов клеток, примерно 3 миллиарда клеток, примерно 30 миллиардов клеток, примерно 45 миллиардов клеток) или любое значение между этими диапазонами и/или на килограмм массы тела. Дозы могут варьироваться в зависимости от конкретного заболевания или расстройства и/или пациента и/или другого лечения.

В некоторых вариантах осуществления, дозой клеток является базовая доза или фиксированная доза клеток, такая как доза клеток, не связанная или основанная на площади поверхности тела или массе субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, например, если субъектом является человека, доза включает менее чем примерно 5×10^8 всего экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), например, в интервале примерно 1×10^6 до 5×10^8 таких клеток, например, 2×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8 или 5×10^8 всего таких клеток или диапазон между любыми двумя из вышеописанных значений.

В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от или от примерно 1×10^5 до 5×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^5 до $2{,}5\times10^8$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^5 до 1×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^5 до 5×10^7 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^5 до $2{,}5\times10^7$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^5 до 1×10^7 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^5 до 5×10^6 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^5 до $2{,}5\times10^6$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^5 до 1×10^6 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^6 до 5×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^6 до $2{,}5\times10^8$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^6 до 1×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^6 до 5×10^7 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^6 до $2{,}5\times10^7$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^6 до 1×10^7 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^6 до 5×10^6 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^6 до $2{,}5\times10^6$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, $2{,}5\times10^6$ до 5×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, $2{,}5\times10^6$ до $2{,}5\times10^8$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, $2{,}5\times10^6$ до 1×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, $2{,}5\times10^6$ до 5×10^7 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, $2{,}5\times10^6$ до $2{,}5\times10^7$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, $2{,}5\times10^6$ до 1×10^7 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, $2{,}5\times10^6$ до 5×10^6 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 5×10^6 до 5×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 5×10^6 до $2{,}5\times10^8$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 5×10^6 до 1×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 5×10^6 до 5×10^7 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 5×10^6 до $2{,}5\times10^7$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 5×10^6 до 1×10^7 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^7 до 5×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^7 до $2{,}5\times10^8$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^7 до 1×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^7 до 5×10^7 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^7 до $2{,}5\times10^7$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, $2{,}5\times10^7$ до 5×10^8 всего CAR-

экспрессирующих Т-клеток, $2,5\times10^7$ до $2,5\times10^8$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, $2,5\times10^7$ до 1×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, $2,5\times10^7$ до 5×10^7 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 5×10^7 до 5×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 5×10^7 до $2,5\times10^8$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 5×10^7 до 1×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^8 до 5×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, 1×10^8 до $2,5\times10^8$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток или $2,5\times10^8$ до 5×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^5 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5\times10^5$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^5 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5\times10^6$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5\times10^7$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^8 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5\times10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^8 CAR-экспрессирующих Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или от примерно 1×10^5 до 5×10^8 всего экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, всего Т-клеток или всего мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), от или от примерно 5×10^5 до 1×10^7 всего экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общие Т-клеток или общие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) или от или от примерно 1×10^6 to 1×10^7total экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, всего Т-клеток или всего мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), все включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы клеток, содержащей количество клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^5 всего экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, всего Т-клеток или всего мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, 1×10^6, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^7, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^8 таких клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество дано относительно всего количества CD3+ или CD8+, в некоторых случаях также экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например CAR+) клеток. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или от примерно 1×10^5 до

5×10^8CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, от или от примерно 5×10^5 до 1×10^7CD3+ или CD8+ всего Т-клеток, или CD3+ или CD8+ экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток или от или от примерно 1×10^6 до 1×10^7CD3+ или CD8+ всего Т-клеток, или CD3+ или CD8+ экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или от примерно 1×10^5 до 5×10^8 всего CD3+/CAR+ или CD8+/CAR+ клеток, от или от примерно 5×10^5 до 1×10^7 всего CD3+/CAR+ или CD8+/CAR+ клеток или от или от примерно 1×10^6 до 1×10^7 всего CD3+/CAR+ или CD8+/CAR+ клеток, все включительно.

В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток включает CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или CD4+ и CD8+ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, например, если субъектом является человек, доза CD8+ Т-клеток, включая дозу, включающую CD4+ и CD8+ Т-клетки, включает от примерно 1×10^6 до 5×10^8 всего экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) CD8+клеток, например, в диапазоне примерно 5×10^6 до 1×10^8 таких клеток, таких клеток 1×10^7, $2{,}5\times10^7$, 5×10^7, $7{,}5\times10^7$, 1×10^8 или 5×10^8 всего таких клеток, или диапазон между любыми двумя из вышеперечисленных значений. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят множество доз, и каждая доза или общее количество доз может быть в пределах любого из вышеперечисленных значений. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток включает введение от или от примерно 1×10^7 до $0{,}75\times10^8$ всего экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, 1×10^7 до $2{,}5\times10^7$ всего экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, от или от примерно 1×10^7 до $0{,}75\times10^8$ всего экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток включает введение точно или примерно 1×10^7, $2{,}5\times10^7$, 5×10^7 $7{,}5\times10^7$, 1×10^8 или 5×10^8 всего экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, дозу клеток, например, экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, вводят субъекту в виде одной дозы, или вводят только один раз в течение двух недель, одного месяца, трех месяцев, шести месяцев, 1 года или более.

В контексте адоптивной клеточной терапии, введение данной «дозы» включает введение данного количества или количества клеток в виде одного композиции и/или однократного непрерывного введения, например, в виде однократной инъекции или непрерывной инфузии, и также включает введение заданного количества или количества клеток в виде дробной дозы или в виде множества композиций, представленных в виде множества индивидуальных композиций или инфузий, в течение определенного периода времени, например, в течение не более 3 дней. Таким образом, в некоторых контекстах, дозой является однократное или непрерывное введение определенного количества клеток, данное или инициированное в один момент времени. В некоторых контекстах, однако,

дозу вводят в виде множества инъекций или инфузий в течение периода не более трех дней, например, один раз в день в течение трех дней или в течение двух дней, или более инфузиями в течение одного дня.

Таким образом, в некоторых аспектах, дозы клеток вводят в виде единой фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления, дозу клеток вводят в виде множества композиций, совокупно содержащих дозу клеток.

В некоторых вариантах осуществления, термин «дробная доза» относится к дозе, разделенной таким образом, чтобы вводить ее в течение более чем одного дня. Этот тип дозирования охватывается настоящими способами и считается разовой дозой.

Таким образом, доза клеток может быть введена в виде дробной дозы, например, дробной дозы, вводимой в течение определенного времени. Например, в некоторых вариантах осуществления, доза может вводиться субъекту в течение 2 дней или более 3 дней. Типовые способы дробного дозирования включают введение 25% дозы в первый день и введение остальных 75% дозы во второй день. В других вариантах осуществления, 33% дозы могут быть введены в первый день, а оставшиеся 67% дозы могут быть введены во второй день. В некоторых аспектах, 10% дозы вводят в первый день, 30% дозы водят на второй день и 60% дозы вводят на третий день. В некоторых вариантах осуществления, дробное дозирование не длится более чем 3 дней.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток может быть введена ведением множества композиций или растворов, таких как первый или второй, необязательно, больше, где каждая содержит одинаковую дозу клеток. В некоторых аспектах, множество композиций, каждая из которых содержит разные популяции и/или подтипы клеток, вводят отдельно или независимо, необязательно в пределах определенного периода времени. Например, популяция или подтипы клеток могут включать $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки, соответственно, и/или CD8+- и CD4+-обогащенные популяции, соответственно, например, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, каждая из которых индивидуально включает клетки, генетически сконструированные для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, введение дозы включает введение первой композиции, содержащей дозу CD8+ Т-клеток или дозу CD4+ Т-клеток, и введение второй композиции, содержащей другие дозы CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, введение композиции или дозы, например, введение множества клеточных композиций, включает введение клеточных композиций по отдельности. В некоторых аспектах, раздельное введение проводят одновременно или последовательно, в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления, доза содержит первую композицию и вторую композицию, и первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от 0 до 12 часов, от 0 до 6 часов или от 0 до 2 часов. В некоторых вариантах осуществления, начало введения первой композиции и начало введения второй композиции осуществляют с интервалом не более чем 2 часа, не более чем 1 час или не более чем 30 минут, не более чем 15 минут, не более чем 10 минут или не более чем 5 минут. В некоторых вариантах осуществления, начало и/или завершение введения первой

композиции и завершение и/или начало введения второй композиции проводят с интервалом не более чем 2 часа, не более чем 1 час или не более чем 30 минут, не более чем 15 минут, не более чем 10 минут или не более чем 5 минут.

В некоторых композициях, первая композиция, например, первая композиция дозы, содержит CD4+ Т-клетки. В некоторых композициях, первая композиция, например, первая композиция дозы, содержит CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, первую композицию вводится до второй композиции.

В некоторых вариантах осуществления, доза или композиция клеток включает определенное или целевое отношение CD4+ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, к CD8+ клеткам, экспрессирующим рекомбинантный рецептор, и/или CD4+ клеток к CD8+ клеткам, где отношение необязательно составляет приблизительно 1:1 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1, например, приблизительно 1:1. В некоторых аспектах, введение композиции или дозы с целевым или желаемым отношение разных клеточных популяций (например, отношением CD4+:CD8+ или отношением CAR+CD4+:CAR+CD8+, например, 1:1) включает введение клеточной композиции, содержащей одну популяцию, с последующим введением отдельной клеточной композиции, содержащей другие популяции, где введение происходит при или при приблизительно целевом или желаемом отношении. В некоторых аспектах, введение дозы или композиции клеток в определенном отношении дает улучшенное размножение, жизнестойкость и/или противоопухолевую активность Т-клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъект получает несколько доз, например, две или более доз, или более последовательных доз клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят две дозы. В некоторых вариантах осуществления, субъект получает последовательную дозу, например, вторую дозу вводят приблизительно через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, несколько последовательных доз вводят после первой дозы, так что дополнительная доза или дозы вводятся после введения последовательной дозы. В некоторых аспектах, количество клеток, вводимых субъекту в дополнительной дозе, такое же или подобное первой дозе и/или последующей дозе. В некоторых вариантах осуществления, дополнительная доза или дозы больше, чем предыдущие дозы.

В некоторых аспектах, размер первой и/или последующей дозы определяют на основе одного или более критериев, таких как ответ субъекта на предыдущее лечение, например, химиотерапию, тяжесть заболевания у субъекта, такая как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, протяженность или тип метастазов, стадия и/или вероятность или частота развития токсических исходов у субъекта, например, CRS, синдром активации макрофагов, синдром лизиса опухоли, нейротоксичность и/или иммунный ответ хозяина против клеток и/или рекомбинантных рецепторов, которые вводят.

В некоторых аспектах, время между введением первой дозы и введением следующей дозы составляет примерно от 9 до примерно 35 дней, примерно от 14 до

примерно 28 дней или от 15 до 27 дней. В некоторых вариантах осуществления, введение последующей дозы происходит в момент времени более чем примерно через 14 дней после и менее чем примерно через 28 дней после введения первой дозы. В некоторых аспектах, время между первой и последующей дозой составляет примерно 21 день. В некоторых вариантах осуществления, дополнительную дозу или дозы, например, последующие дозы, вводят после введения последующей дозы. В некоторых аспектах, дополнительную последующую дозу или дозы вводят, по меньшей мере, примерно через 14 и менее чем примерно 28 дней после введения предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления, дополнительную дозу вводят менее чем примерно через 14 дней после предыдущей дозы, например, через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 дней после предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления, дозу не вводят менее чем примерно через 14 дней после предыдущей дозы, и/или дозу не вводят более чем примерно через 28 дней после предыдущей дозы.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, например, клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, содержит две дозы (например, двойную дозу), содержащую первую дозу Т-клеток и последующую дозу Т-клеток, где одна или обе, первая доза и вторая доза, включают введение дробной дозы Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток в общем является достаточно большой, чтобы быть эффективной при снижении тяжести заболевания.

В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят в желаемой дозировке, которая, в некоторых аспектах, включает желаемую дозу или количество клеток или типов клеток и/или желаемое соотношение типов клеток. Таким образом, дозировка клеток, в некоторых вариантах осуществления, основана на общем количестве клеток (или количестве на кг массы тела) и желаемом соотношении индивидуальных популяций или подтипов, таком как соотношение CD4+ к CD8+. В некоторых вариантах осуществления, дозировка клеток основана на желаемом общем количестве (или количестве на кг массы тела) клеток в индивидуальной популяции или индивидуальных клеточных типах. В некоторых вариантах осуществления, дозировка основана на комбинации таких характеристик, как общее желаемое количество клеток, желаемое соотношение и общее желаемое количество клеток в отдельных популяциях.

В некоторых вариантах осуществления, популяция или подтипы клеток, таких как $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки, вводят в пределах или в пределах допустимой разницы желаемой дозы для общих клеток, такой как желаемая доза Т-клеток. В некоторых аспектах, желаемой дозой является желаемое число клеток или желаемое число клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, например, клетки/кг. В некоторых аспектах, желаемая доза составляет или превышает минимальное количество клеток или минимальное количество клеток на единицу массы тела. В некоторых аспектах, общие клетки, вводимые в желаемой дозе, индивидуальные популяции или подтипы присутствуют при желаемом выходном отношении или близко к нему (например, отношении $CD4^+$ к $CD8^+$), например, в пределах определенной допустимой разницы или

ошибки такого соотношения.

В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят в пределах или в пределах допустимого различия желаемой дозы одной или более отдельных популяций или подтипов клеток, такой как желаемая доза CD4+ клеток и/или желаемая доза CD8+ клеток. В некоторых аспектах, желаемой дозой является желаемое количество клеток подтипа или популяции, или желаемое количество таких клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, например, клетки/кг. В некоторых аспектах, желаемая доза равна или превышает минимальное количество клеточных популяций или подтипа, или минимальное количество клеточных популяций или подтип на единицу массы тела.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, дозировка основана на желаемой фиксированной дозе общих клеток и желаемом отношении и/или на основе желаемой фиксированной дозы одного или более, например, каждого из индивидуальных подтипов или субпопуляций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, дозировка основана на желаемой фиксированной или минимальной дозе Т-клеток и желаемом отношении $CD4^+$ к $CD8^+$ клеткам, и/или основана на желаемой фиксированной или минимальной дозе $CD4^+$ и/или $CD8^+$ клеток.

В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в пределах или в пределах допустимого диапазона желаемого выходного отношения множества клеточных популяций или подтипов, таких как клетки CD4+ и CD8+ или их подтипы. В некоторых аспектах, желаемое отношение может быть удельным отношением или может быть диапазоном отношений. Например, в некоторых вариантах осуществления желаемое отношение (например, отношение $CD4^+$ к $CD8^+$ клеткам) составляет от точно или примерно 5:1 и точно или примерно 5:1 (или более чем примерно 1:5 и менее чем примерно 5:1) или от точно или примерно 1:3 и точно или примерно 3:1 (или более чем примерно 1:3 и менее чем примерно 3:1), например, от точно или примерно 2:1 и точно или примерно 1:5 (или более чем примерно 1:5 и менее чем примерно 2:1, например, точно или примерно 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9: 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 или 1:5. В некоторых аспектах, допустимая разница составляет в пределах примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4% примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50% от желаемого отношения, включая любое значение между этими диапазонами.

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

В некоторых аспектах, размер дозы определяется на основе одного или более критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например

химиотерапию, тяжесть заболевания у субъекта, такая как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, степень или тип метастазов, стадия и/или вероятность или частота развития у субъекта токсических исходов, например, CRS, синдром макрофагальной активации, синдром лизиса опухоли, нейротоксичность и/или иммунный ответ хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

В некоторых вариантах осуществления, способы также включают введение одной или более дополнительных доз клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) и/или противолимфомную терапию, и/или повторение одного или более стадий способов. В некоторых вариантах осуществления, одна или более дополнительных доз являются такими же, как начальная доза. В некоторых вариантах осуществления одна или более дополнительных доз отличаются от начальной дозы, например, более высокой, например, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно или 10-кратно, или еще выше, чем исходная доза, или ниже, например, выше, например, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно или 10-кратно или более ниже, чем исходная доза. В некоторых вариантах осуществления, введение одной или более дополнительных доз определяют на основе ответа субъекта на начальное лечение или любое предшествующее лечение, тяжесть заболевания у субъекта, такую как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, степень или тип метастазов, стадия и/или вероятность или частота возникновения у субъекта токсического исхода, например, CRS, синдром активации макрофагов, синдром лизиса опухоли, нейротоксичность, и/или иммунный ответ хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

VII. КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит клетки, сконструированные с рекомбинантным антигенным рецептором, например CAR или TCR, представляется в виде композиции или состава, такого как фармацевтическая композиция или состав. Такие композиции могут применяться в соответствии с представленными способами и/или с представленными изделиями производства или композициями, например, для профилактики или лечения заболеваний, состояний и расстройств или в методах обнаружения, диагностики и прогнозирования.

Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который имеет такую форму, чтобы обеспечить эффективность биологической активности активного ингредиента, содержащегося в нем, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому вводят состав.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтического состава, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничен ими, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

В некоторых аспектах, выбор носителя частично определяется конкретной клеткой или агентом и/или способом введения. Соответственно, существует множество подходящих составов. Например, фармацевтическая композиция может содержать

консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. В некоторых аспектах используют смесь двух или более консервантов. Консерванты или их смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,0001% до примерно 2% от общей массы композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители в целом нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничены ими: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлические комплексы (например, Zn-протеиновые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

Буферные агенты в некоторых аспектах включены в композиции. Подходящие буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах используют смесь двух или более буферных агентов. Буферный агент или их смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,001% до примерно 4% от общей массы композиции. Способы получения фармацевтических композиций для введения известны. Типовые способы описаны более подробно в, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

Состав или композиция может также содержать более чем один активный ингредиент, полезный для конкретного показания, заболевания или состояния, которое предотвращается или лечится клетками или агентами, когда соответствующие активности не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Такие активные ингредиенты обычно присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для предполагаемой цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно включает другие фармацевтически активные агенты или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические агенты, например, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.д. В некоторых вариантах осуществления агенты или клетки вводят в форме соли, например, фармацевтически приемлемой соли. Подходящие

фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли включают соли, полученные из минеральных кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, и органических кислот, таких как винная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, фумаровая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная и арилсульфоновая кислоты, например, п-толуолсульфоновая кислота.

Фармацевтическая композиция в некоторых вариантах осуществления содержит агенты или клетки в количествах, эффективных для лечения или профилактики заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическую или профилактическую эффективность в некоторых вариантах осуществления отслеживают путем периодической оценки субъектов, получающих лечение. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако могут быть полезны и другие схемы дозирования, и они могут быть определены. Желаемая доза может быть доставлена однократным болюсным введением композиции, многократным болюсным введением композиции или непрерывным инфузионным введением композиции.

Агенты или клетки могут быть введены любыми подходящими способами, например, болюсной инфузией, инъекцией, например, внутривенными или подкожными инъекциями, внутриглазной инъекцией, периокулярной инъекцией, субретинальной инъекцией, интравитреальной инъекцией, транс-септальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, интрахориоидальной инъекцией, внутрикамерной инъекцией, субконъюнктивной инъекцией, субконъюнтивальной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перибульбарной инъекцией или доставкой в заднюю околосклеральную область. В некоторых вариантах осуществления их вводят парентерально, внутрилегочно и интраназально и, если желательно для местного лечения, внутриочагово. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления, данную дозу вводят однократным болюсным введением клеток или агента. В некоторых вариантах осуществления, ее вводят множественным болюсным введением клеток или агента, например, в течение периода не более 3 дней или непрерывным инфузионным введением клеток или агента.

Для профилактики или лечения заболевания, подходящая дозировка может зависеть от типа заболевания, которое подлежит лечению, типа агента или агентов, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, независимо от того, вводят ли агент или клетки в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни субъекта и ответа на агент или клетки, и на усмотрение лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления, композиции вводят субъекту за один раз или в течение серии курсов лечения.

Клетки или агенты могут быть введены с использованием стандартных методов введения, составов и/или устройств. Представлены составы и устройства, такие как

шприцы и флаконы, для хранения и введения композиций. Что касается клеток, введение может быть аутологичным или гетерологичным. Например, иммунореактивные клетки или предшественники могут быть получены от одного субъекта и введены тому же субъекту или другому совместимому субъекту. Иммунореактивные клетки, полученные из периферической крови, или их потомство (например, полученное in vivo, ex vivo или in vitro) могут быть введены местной инъекцией, включая катетерное введение, системную инъекцию, локализованную инъекцию, внутривенную инъекцию или парентеральное введение. При введении терапевтической композиции (например, фармацевтической композиции, содержащей генетически модифицированные иммунореактивные клетки или агент, который лечит или ослабляет симптомы нейротоксичности), она в общем будет составлена в виде стандартной дозированной формы для инъекции (раствора, суспензии, эмульсии).

Составы включают составы для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, легочного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, буккального, сублингвального введения или суппозиторного введения. В некоторых вариантах осуществления, агент или клеточные популяции вводят парентерально. Термин «парентеральный», используемый в настоящем документе, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В некоторых вариантах осуществления, агент или клеточные популяции вводят субъекту с использованием периферической системной доставки путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

Композиции в некоторых вариантах осуществления представлены в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые в некоторых аспектах могут быть забуференными до выбранного pH. Жидкие препараты обычно легче приготовить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Дополнительно, жидкие композиции несколько удобнее вводить, особенно инъекцией. Вязкие композиции, с другой стороны, могут быть составлены в соответствующем диапазоне вязкости для обеспечения более длительных периодов контакта с определенными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут быть растворителем или диспергирующей средой, содержащей, например, воду, солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены введением агента или клеток в растворитель, такой как смесь с подходящим носителем, разбавителем или эксципиентом, такой как стерильная вода, солевой раствор, глюкоза, декстроза или подобные.

Составы, используемые для введения in vivo, обычно являются стерильными. Стерильность может быть легко достигнута, например, фильтрацией через стерильные фильтрующие мембраны.

VIII. ИЗДЕЛИЯ ПРОИЗВОДСТВА И НАБОРЫ

Также предоставляются изделия производства, системы, аппараты и комплекты, используемые в представленных способах. Также представлены изделия производства, включающие: (i) один или более реагентов для селектирования на основе иммуноаффинности клеток специфических для CD57, CD4 и/или CD8; и (ii) инструкции по использованию одного или более реагентов для выполнения любых способов, описанных в настоящем документе.

Также представлены изделия производства, включающие: (i) один или более реагентов для селектирования на основе иммуноаффинности клеток, специфических для CD57, CD4 и/или CD8; (ii) один или более стимулирующих реагентов, способных активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов комплекса TCR и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул; и (iii) инструкции по использованию одного или более реагентов для выполнения любых способов, описанных в настоящем документе.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, реагент для селектирование на основе иммуноаффинности является или включает антитело, способное специфически связываться с CD57, CD4 или CD8. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, реагент для селектирования на основе иммуноаффинности является или включает антитело, способное специфически связываться с CD57. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, антитело иммобилизовано на магнитной частице или является иммобилизованным на или присоединенным к матрице для аффинной хроматографии.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, стимулирующий реагент включает (i) первичный агент, который специфически связывается с членом TCR комплекса, необязательно, который специфически связывается с CD3, и (ii) вторичный агент, который специфически связывается с костимулирующей молекулой Т-клетки, необязательно, где костимулирующую молекулу выбирают из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, один или оба, первичные и вторичные агенты, включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, первичные и вторичные агенты включают антитело, необязательно, где стимулирующий реагент включает инкубирование с анти-CD3 антителом и анти-CD28 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, первичный агент и вторичный агент присутствуют или присоединены на поверхности твердой подложки. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, твердая подложка является или включает гранулу, необязательно, парамагнитную гранулу. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, первичный агент и вторичный агент обратимо связаны на поверхности реагента из олигомерных частиц, включающих множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина.

Также представлены изделия производства, включающие (i) любые композиции,

описанные в настоящем документе; и (ii) инструкции по введению композиции субъекту.

В некоторых вариантах осуществления изделия производства или наборы включают один или более контейнеров, обычно, множество контейнеров, упаковывающий материал и этикетку или вкладыш в упаковку на или связанные с контейнером или контейнерами и/или упаковкой, в общем, включая инструкции по применению, *например*, инструкции для реагентов для селектирования на основе иммуноаффинности конкретных клеток, например, положительного или отрицательного селектирования клеток, экспрессирующих CD57, CD4 и/или CD8, и инструкции для выполнения любого из способов, представленных в настоящем документе, например, для конструирования Т-клеток для создания композиции, например терапевтической композиции, для клеточной терапии. В некоторых аспектах представленные изделия производства содержат реагенты для стимулирования и/или культивирования клеток, например, на одном или более этапах производственного процесса, такие как любые реагенты, описанные на любых стадиях Раздела II и Раздела III.

Также представлены изделия производства и наборы, содержащие сконструированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, или их композиции, например, полученные с использованием способов, представленных в настоящем документе, и необязательно, инструкции по применению, например, инструкции по введению. В некоторых вариантах осуществления, в инструкциях представлены направления или указаны способы оценки вероятности того, будет ли или предположительно будет ли субъект, до получения клеточной терапии, давать ответ, и/или степени или уровня ответа после введения сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, для лечения заболевания или расстройства. В некоторых аспектах, изделия производства могут содержать дозу или композицию сконструированных клеток.

Изделия производства, представленные в настоящем документе, содержит упаковывающие материалы. Упаковывающие материалы для применения для упаковки представленных материалов, хорошо известны в данной области техники. См., например, патенты США №№ 5,323,907, 5,052,558 и 5,033,252, каждый из которых включен в настоящий документ полностью. Примеры упаковывающих материалов включают, но не ограничены ими, блистерные упаковки, бутылки, пробирки, ингаляторы, насосы, пакеты, флаконы, контейнеры, шприцы, одноразовые лабораторные принадлежности, *например*, наконечники для пипеток и/или пластиковые тарелки или бутылки. Изделия производства или наборы могут включать в себя устройство для облегчения дозирования материалов или для облегчения использования с высокой производительностью или крупномасштабным способом, *например*, для облегчения использования в роботизированном оборудовании. Обычно упаковка не реагирует с композицией, содержащейся в ней.

В некоторых вариантах осуществления, реагенты и/или клеточные композиции упакованы отдельно. В некоторых вариантах осуществления, каждый контейнер может

иметь один компартмент. В некоторых вариантах осуществления, другие компоненты изделий производства или наборов упакованы по отдельности или вместе в одном компартменте.

IX. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, все термины из области техники, обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится заявленный объект изобретения. В некоторых случаях, термины с общепринятыми значениями определены в настоящем документе для ясности и/или для удобства, и включение таких определений в настоящий документ не обязательно должно толковаться как представляющее существенное отличие от того, что в общем понимается в данной области техники.

Как используется в настоящем документе, формы единственного числа «a», «an» и «the» включают ссылки во множественном числе, если контекст явно не диктует иное. Например, «a» или «an» означает «по меньшей мере, один» или «один или более». Понятно, что аспекты и варианты, описанные в настоящем документе, включают «состоящий» и/или «состоящий по существу из» аспектов и вариантов.

В настоящем описании, различные аспекты заявленного объекта изобретения представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона дано просто для удобства и краткости и не должно толковаться как жесткое ограничение объема заявленного объекта изобретения. Соответственно, следует рассматривать описание диапазона, чтобы специфически раскрыть все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, если представлен диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим заявленным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне охватывается в пределах заявленного объекта изобретения. Верхние и нижние пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в заявленный объект изобретения с учетом любого специфически исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба из этих включенных пределов, также включены в заявленный объект изобретения. Это применимо независимо от широты диапазона.

Термин «примерно», используемый в настоящем документе, относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, который хорошо известен. Ссылка на «примерное» значение или параметр в настоящем документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр как таковой. Например, описание со ссылкой на «примерно X» включает описание «X». В некоторых вариантах осуществления «примерно X» относится к значению ±25%, ±10%, ±5%, ±2%, ±1%, ±0,1% или ±0,01% от X.

Как используется в настоящем документе, указание того, что нуклеотиды или

аминокислотные положения «соответствуют» нуклеотидам или аминокислотным положениям в описанной последовательности, такой как указана в Списке последовательностей, относится к нуклеотидам или аминокислотным положениям, идентифицированным при выравнивании с описанной последовательностью, чтобы максимизировать идентичность с использованием стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP. Выравнивая последовательности, можно идентифицировать соответствующие остатки, например, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве ориентиров. В общем, для идентификации соответствующих положений, последовательности аминокислот выровнены так, чтобы получить совпадение наивысшего порядка (см., например: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New.Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 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).

Термин «вектор», используемый в настоящем документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Термин включает вектор как самореплицирующую структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. В настоящем документе такие векторы называются «вектор экспрессии». Среди векторов есть вирусные векторы, такие как ретровирусный, например, гаммаретровирусный и лентивирусный вектор.

Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первичные трансформированные клетки и полученное из них потомство, независимо от количества пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным родительской клетке по содержанию нуклеиновых кислот, но может содержать мутации. В настоящий документ включены мутантные потомки, которые обладают той же функцией или биологической активностью, которая отсортирована или отобрана в первоначально трансформированной клетке.

В настоящем документе утверждение о том, что клетка или популяция клеток является «положительной» для определенного маркера, относится к обнаруживаемому присутствию на или в клетке определенного маркера, обычно поверхностного маркера. В отношении поверхностного маркера, этот термин относится к наличию поверхностной экспрессии, обнаруженной проточной цитометрией, например, при окрашивании антителом, которое специфически связывается с маркером, и обнаружении указанного

антитела, где окрашивание обнаруживается проточной цитометрией на уровне, существенно превышающем окрашивание, обнаруженное при выполнении той же процедуры с подобранным по изотипу контролем при в другом идентичных условиях, и/или на уровне, по существу аналогичном уровню для клетки, заведомо положительной для маркера, и/или на уровне, по существу превышающем уровень для клетки, заведомо отрицательной для маркера.

Как используется в настоящем документе, утверждение, что клетка или популяция клеток является «отрицательной» для определенного маркера, относится к отсутствию по существу обнаруживаемого присутствия на или в клетке определенного маркера, обычно поверхностного маркера. В отношении поверхностного маркера, этот термин относится к отсутствию поверхностной экспрессии, обнаруженной проточной цитометрией, например, при окрашивании антителом, которое специфически связывается с маркером, и обнаружении указанного антитела, где окрашивание не обнаруживается проточной цитометрией на уровне, существенно превышающем окрашивание, обнаруженное при выполнении той же процедуры с подобранным по изотипу контролем при в другом идентичных условиях, и/или на уровне, по существу ниже, чем уровень для клетки, заведомо положительной для маркера, и/или на уровне, по существу аналогичном уровню для клетки, заведомо отрицательной для маркера.

В настоящем документе «доля (%) идентичности аминокислот» и «доля идентичности» при использовании по отношению к аминокислотной последовательности (эталонной полипептидной последовательности) определяется как доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности (например, рассматриваемом антителе или фрагменте), которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимальной доли идентичности последовательности, и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание для целей определения доли идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными известными способами, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Могут быть определены подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Аминокислотные замены могут включать замену одной аминокислоты в полипептиде на другую аминокислоту. Замена может быть консервативной аминокислотной заменой или не консервативной аминокислотной заменой. Аминокислотные замены могут быть введены в связывающую молекулу, например, антитело, представляющую интерес, и продукты, отобранные по желаемой активности, *например*, сохраненному/улучшенному антигенному связыванию, сниженной иммуногенности или улучшенной ADCC или CDC.

Аминокислоты в общем могут быть сгруппированы согласно следующих общих свойств боковой цепи:

(1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) кислые: Asp, Glu;

(4) основные: His, Lys, Arg;

(5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;

(6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

В некоторых вариантах осуществления, консервативные замены могут включать замену члена одного из этих классов на другого члена того же класса. В некоторых вариантах осуществления, не консервативные аминокислотные замены могут включать замену члена одного из этих классов на другой класс.

В настоящем документе композиция относится к любой смеси двух или более продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водный, не водный или любая их комбинация.

Как используется в настоящем документе, «субъектом» является млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно является человек.

X. ТИПОВЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Представленные варианты осуществления включают:

1. Способ обогащения Т-клеток, где способ включает: (a) проведение первого селектирования, где первое селектирование включает обогащение любых из CD57- или CD3+ Т-клеток из биологического образца, содержащего продукт афереза или продукт лейкафереза, содержащий первичные Т-клетки человека, тем самым создавая обогащенную популяцию Т-клеток; и (b) проведение второго селектирования на клетках из обогащенной популяции Т-клеток, где: первое селектирование включает обогащение CD57- Т-клеток и второе селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из обогащенной популяции; или первое селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток и второе селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из обогащенной Т-клеточной популяции, где способ создает истощенную популяцию, содержащую меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец, и обогащенные CD3+ Т-клетки.

2. Способ обогащения Т-клеток, где способ включает (a) проведение первого селектирования, где первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец; и (b) проведение второго селектирования на клетках из истощенной популяции, где второе селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из истощенной популяции, где обогащение тем самым создает обогащенную популяцию CD57-CD3+ Т-клеток.

3. Способ обогащения Т-клеток, где способ включает: (a) проведение первого селектирования, где первое селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из

биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая обогащенную популяцию Т-клеток; и (b) проведение второго селектирования на клетках из обогащенной популяции Т-клеток, где второе селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из обогащенного образца популяции клеток, тем самым создавая истощенную популяцию, где истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец и/или чем обогащенная популяция Т-клеток, и обогащена CD3+ Т-клетками.

4. Способ обогащения Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где указанное первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая первую истощенную популяцию, где указанная первая истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец;

(b) проведение второго селектирования на клетках из первой истощенной популяции, где указанное второе селектирование включает обогащение одних из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток из первой истощенной популяции, где обогащение тем самым создает вторую истощенную популяцию, обогащенную одними из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток и не селектированную популяцию; и

(c) проведение третьего селектирования, где указанное третье селектирование включает обогащение других из (i) CD4+ клеток и (ii) CD8+ клеток из не селектированной популяции, где обогащение тем самым создает третью истощенную популяцию, обогащенную другими из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток.

5. Способ по любому из вариантов осуществления 1-4, где истощенная популяция (необязательно, первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, одно из следующих:

(i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток;

(ii) частоту CD57+ Т-клеток, которая составляет менее чем или примерно 35% от частоты CD57+ Т-клеток, присутствующих в биологическом образце;

(iii) CD4+ Т-клетки, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD4+ Т-клеток являются CD57-; и

(iv) CD8+ Т-клетки, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD8+ Т-клеток являются CD57-.

6. Способ по любому из вариантов осуществления 1-5, где биологический образец содержит продукт афереза или продукт лейкафереза.

7. Способ обогащения Т-клеток, где способ включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего продукт афереза или продукт лейкафереза, содержащий первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию Т-клеток, где истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец, и где истощенная популяция содержит:

(i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток;

(ii) частоту CD57+ Т-клеток, которая составляет менее чем или примерно 35% от частоты CD57+ Т-клеток, присутствующих в биологическом образце;

(iii) CD4+ Т-клеток, где по меньшей мере, точно или примерно 95% CD4+ Т-клеток являются CD57-; и/или

(iv) CD8+ Т-клеток, где по меньшей мере, точно или примерно 95% CD8+ Т-клеток являются CD57-.

8. Способ по варианту осуществления 7, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD4+ Т-клеток истощенной популяции содержит CD57-CD4+ Т-клетки.

9. Способ по варианту осуществления 7, где по меньшей мере, точно или примерно 95% CD8+ Т-клеток истощенной популяции содержит CD57- CD8+ Т-клетки.

10. Способ по любому из вариантов осуществления 7-9, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток истощенной популяции содержит CD57-CD4+ Т-клеток и CD57-CD8+ Т-клеток.

11. Способ по любому из вариантов осуществления 1-10, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD3+ Т-клеток истощенной популяции содержит CD57-CD3+ Т-клетки.

12. Способ по любому из вариантов осуществления 7-10, где истощенная популяция является первой истощенной популяцией, и способ дополнительно содержит селектирование для CD4+ Т-клеток из первой истощенной популяции, тем самым создавая вторую истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD4+ Т-клеток, и не селектированную популяцию.

13. Способ по варианту осуществления 12, где способ дополнительно содержит селектирование для CD8+ Т-клеток из не селектированной популяции, тем самым создавая третью истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD8+ Т-клеток и вторую не селектированную популяцию.

14. Способ по любому из вариантов осуществления 7-10, где истощенная популяция является первой истощенной популяцией, и способ дополнительно содержит селектирование для CD8+ Т-клеток из первой истощенной популяции, тем самым создавая вторую истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD8+ Т-клеток и не селектированную популяцию.

15. Способ по варианту осуществления 14, где способ дополнительно содержит селектирование для CD4+ Т-клеток из не селектированной популяции, тем самым создавая третью истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD4+ Т-клеток и вторую не селектированную популяцию.

16. Способ по любому из вариантов осуществления 7-11, где истощенная популяция является первой истощенной популяцией, и способ дополнительно содержит селектирование для CD3+ Т-клеток из первой истощенной популяции, тем самым создавая вторую истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD3+ Т-клеток, и не селектированную популяцию.

17. Способ по варианту осуществления 16, где истощенная популяция

(необязательно первая истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, одно из следующих:

(i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток;

(ii) частоту CD57+ Т-клеток, которая составляет менее чем или примерно 35% от частоты CD57+ Т-клеток, присутствующих в биологическом образце;

(iii) CD4+ Т-клетки, где по меньшей мере, точно или примерно 95% CD4+ Т-клеток являются CD57-; и

(iv) CD8+ Т-клетки, где по меньшей мере, точно или примерно 95% CD8+ Т-клеток являются CD57-.

18. Способ по варианту осуществления 17, где по меньшей мере, точно или примерно 95% CD3+ Т-клеток истощенной популяции содержат CD57-CD3+ Т-клетки.

19. Способ по варианту осуществления 17 или варианту осуществления 18, дополнительно включающий обогащение CD3+ Т-клеток из биологического образца до удаления CD57+ Т-клеток, тем самым создавая обогащенный CD3+ Т-клетками биологический образец для удаления CD57+ Т-клеток.

20. Способ по варианту осуществления 17 или варианту осуществления 18, где истощенная популяция является первой истощенной популяцией и способ дополнительно включает обогащение CD3+ Т-клеток из первой истощенной популяции, тем самым создавая обогащенную популяцию CD57-CD3+ Т-клеток.

21. Способ обогащения Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего продукт афереза или продукт лейкафереза, содержащий первичные Т-клетки человека, тем самым создавая первую истощенную популяцию, где первая истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец; и

(b) проведение второго селектирования на клетках из первой истощенной популяции, где второе селектирование содержит обогащение CD3+ Т-клеток из первой истощенной популяции, обогащение тем самым создает обогащенную популяцию CD57-CD3+ Т-клеток.

22. Способ обогащения Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, первое селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из биологического образца, содержащего продукт афереза или продукт лейкафереза, содержащий первичные Т-клетки человека, тем самым создавая обогащенный биологический образец; и

(b) проведение второго селектирования на клетках из обогащенного биологического образца, где второе селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из обогащенного биологического образца, тем самым создавая истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD3+ Т-клеток,

23. Способ по любому из вариантов осуществления 1-22, где частота CD57+ Т-клеток в истощенной популяции (необязательно первой истощенной популяции, второй

истощенной популяции или третьей истощенной популяции) составляет менее чем или примерно 35%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% или 0,1% от частоты CD57+ Т-клеток в биологическом образце.

24. Способ по любому из вариантов осуществления 1-23, где истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит менее чем или примерно 3%, менее чем или примерно 2%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток.

25. Способ по любому из вариантов осуществления 1-24, где истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) не содержит или по существу не содержит CD57+ Т-клетки.

26. Способ по любому из вариантов осуществления 1-25, где частота подобных наивным клеток в истощенной популяции (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) на, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше, чем частота подобных наивным клеток в биологическом образце.

27. Способ по любому из вариантов осуществления 1-26, где частота одних или более из CD25+ Т-клеток, CD27+ Т-клеток, CD28+ Т-клеток, CCR7+ Т-клеток или CD45RA+ Т-клеток в истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) на, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше, чем частота соответствующих клеток в биологическом образце.

28. Способ по любому из вариантов осуществления 1-27, где частота CD28+ Т-клеток в истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) на, по меньшей мере, примерно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше, чем частота соответствующих клеток в биологическом образце.

29. Способ по любому из вариантов осуществления 1-27, где частота CD27+/CD28+ Т-клеток в истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) на, по меньшей мере, примерно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше, чем частота соответствующих клеток в биологическом образце.

30. Способ по любому из вариантов осуществления 1-27, где:

истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, точно или примерно 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 40% CD27+ Т-клеток; или

истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 25%, 30%, 35% или 40% CD28+ Т-клеток.

31. Способ по любому из вариантов осуществления 1-30, где истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток.

32. Способ по любому из вариантов осуществления 1-31, где истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, точно или примерно 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток.

33. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, где истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20% или 25% CCR7+ Т-клеток.

34. Способ по любому из вариантов осуществления 13 или 15-33, дополнительно включает объединение второй истощенной популяции и третьей истощенной популяции, необязательно в отношении от точно или примерно 1:3 и точно или примерно 3:1, необязательно точно или примерно 1:1, тем самым создавая истощенную популяцию, содержащую вторую истощенную популяцию и третью истощенную популяцию.

35. Способ стимулирования Т-клеток, где способ включает инкубирование Т-клеток входной композиции в условиях стимулирования, тем самым создавая стимулированную популяцию Т-клеток, где входная композиция содержит истощенную популяцию (необязательно, первую истощенную популяцию, вторую истощенную популяцию или третью истощенную популяцию), созданную способом по любому из вариантов осуществления 1-34.

36. Способ по любому из вариантов осуществления 1-35, где способ дает композицию Т-клеток, содержащую, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD57-CD4+ Т-клеток.

37. Способ по любому из вариантов осуществления 1-35, где способ дает композицию Т-клеток, содержащую, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD57-CD8+ Т-клеток.

38. Способ по любому из вариантов осуществления 1-35, где способ дает композицию Т-клеток, содержащую, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD57-CD3+ Т-клеток.

39. Способ по варианту осуществления 38, где отношение CD4+ и CD8+ Т-клеток в композиции составляет от 3:1 до 1:3, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5 или от 1,2:1 до 1:1,2,

все включительно.

40. Способ по варианту осуществления 38 или варианту осуществления 39, где отношение CD4+ к CD8+ Т-клеткам в композиции составляет или составляет примерно 1:1 CD4+.

41. Способ по любому из вариантов осуществления 1-40, где первичные Т-клетки получены из субъекта-человека.

42. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, где первичные Т-клетки получены от субъекта с заболеванием или состоянием.

43. Способ по варианту осуществления 42, где заболеванием или состоянием является рак.

44. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, где первичные Т-клетки получены от здорового субъекта.

45. Способ по любому из вариантов осуществления 1-44, где удаление CD57+ Т-клеток включает селектирование на основе иммуноаффинности.

46. Способ по варианту осуществления 45, где селектирование на основе иммуноаффинности включает контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD57, и восстановление клеток, не связанных с антителом, тем самым проводя отрицательное селектирование, где восстановленные клетки истощают CD57+ клетками.

47. Способ по варианту осуществления 45, где первое, второе и/или третье селектирование обогащает для CD4 или CD8 Т-клеток, и селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD4 или CD8, соответственно, и восстановление клеток, связанных с антителом, тем самым осуществляя положительное селектирование, где восстановленные клетки обогащены CD4+ клетками или CD8+ клетками; и где селектирование обогащает для CD3 Т-клеток, и селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD3, и восстановление клеток, связанных с антителом, тем самым осуществляя положительное селектирование, где восстановленные клетки обогащены CD3+ клетками.

48. Способ по варианту осуществления 46 или варианту осуществления 47, где антитело иммобилизовано на твердой поверхности, необязательно, где твердая поверхность является магнитной частицей.

49. Способ по варианту осуществления 48, где антитело иммобилизовано на или присоединено к матрице для аффинной хроматографии; и где антитело дополнительно содержит один или более партнеров связывания, способных образовывать обратимую связь со связывающим реагентом, иммобилизованным на матрице, где антитело обратимо связано с матрицей для хроматографии во время указанного контакта.

50. Способ по варианту осуществления 49, где связывающим реагентом является мутеин стрептавидина, который обратимо связывается с партнером связывания.

51. Способ по варианту осуществления 50, где:

мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность 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:66; 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: 66.

52. Способ по любому из вариантов осуществления 49-51, где партнером связывания является стрептавидин-связывающий пептид.

53. Способ по варианту осуществления 52, где стрептавидин-связывающий пептид выбирают из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 69), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)3-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:78), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:79), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)3-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 70), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)2-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 71) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)2Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 72).

54. Способ по варианту осуществления 52 или варианту осуществления 53, где стрептавидин-связывающий пептид имеет последовательность SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:79).

55. Способ по любому из вариантов осуществления 49-54, дополнительно включающий, после контакта клеток в образце с матрицей для аффинной хроматографии, применяя конкурирующий реагент для разрыва связи между партнером связывания и связывающим реагентом, тем самым восстанавливая клетки, связанные с антителом.

56. Способ по варианту осуществления 55, где конкурирующим реагентом является биотин или аналог биотина.

57. Способ по любому из вариантов осуществления 48-55, где матрица для хроматографии упакована в сепаратор, который является колонкой.

58. Способ по любому из вариантов осуществления 1-57, где биологический образец, содержащий первичные Т-клетки, является образцом, составленным с криопротектором.

59. Способ по любому из вариантов осуществления 13-58, где образец афереза или лейкафереза является образцом, составленным с криопротектором.

60. Способ стимулирования Т-клеток, где способ включает инкубирование Т-клеток входной композиции в условиях стимулирования, тем самым создавая стимулированную популяцию Т-клеток, где входная композиция получена способом по любому из вариантов осуществления 1-59.

61. Способ стимулирования Т-клеток, где способ включает инкубирование Т-

клеток входной композиции в условиях стимулирования, где доля CD57+ Т-клеток во входной композиции ниже пороговой доли CD57+ Т-клеток, где указанный порог составляет не более чем точно или примерно 30% CD57+ Т-клеток.

62. Способ по варианту осуществления 61, где пороговая доля составляет не более чем точно или примерно 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1% CD57+ Т-клеток.

63. Способ по любому из вариантов осуществления 60-62, где входная композиция содержит:

(i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток;

(ii) по меньшей мере, точно или примерно 95% CD57- Т-клеток;

(iii) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD4+ Т-клеток; или

(iv) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD8+ Т-клеток.

64. Способ стимулирования Т-клеток, включающий инкубирование Т-клеток входной композиции в условиях стимулирования, тем самым создавая стимулированную популяцию Т-клеток, где входная композиция содержит:

(i) менее чем примерно или примерно 5% CD57+ Т-клеток

(ii) по меньшей мере, примерно или примерно 95% CD57- Т-клеток;

(iii) по меньшей мере, примерно или примерно 90% CD57-CD4+ Т-клеток; или

(iv) по меньшей мере, примерно или примерно 90% CD57-CD8+ Т-клеток.

65. Способ по любому из вариантов осуществления 60-64, где входная композиция содержит клетки, полученные из биологического образца, содержащего продукт афереза или продукт лейкафереза, содержащий первичные Т-клетки человека.

66. Способ по варианту осуществления 65, дополнительно включающий удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, тем самым создавая входную композицию, содержащую истощенную популяцию Т-клеток.

67. Способ стимулирования Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где указанное первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая первую истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец;

(b) проведение второго селектирования на клетках из первой истощенной популяции, где указанное второе селектирование включает обогащение одних из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток из первой истощенной популяции, где обогащение тем самым создает вторую истощенную популяцию, обогащенную одними из (i) CD57-CD4+ Т-клеток и (ii) CD57-CD8+ Т-клеток, и не селектированную популяцию;

(c) проведение третьего селектирования на клетках из не селектированной популяции, где указанное третье селектирование включает обогащение других из (i) CD4+ клеток и (ii) CD8+ клеток из не селектированной популяции, где обогащение тем самым создает третью истощенную популяцию, обогащенную другими из (i) CD57-CD4+ Т-клеток и (ii) CD57-CD8+ Т-клеток; и

(d) инкубирование одной или более композиций в условиях стимулирования, где

указанная одна или более входных композиций содержат Т-клетки из второй истощенной популяции третьей истощенной популяции.

68. Способ по варианту осуществления 67, где до стадии (d) способ включает объединение второй истощенной популяции и третьей истощенной популяция, тем самым создавая входную композицию, содержащую CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки.

69. Способ по варианту осуществления 67, где стадия (d) включает отдельное инкубирование первой входной композиции и второй входной композиции,

где указанная первая входная композиция содержит Т-клетки из второй истощенной популяции, и указанная вторя входная композиция содержит Т-клетки из третьей истощенной популяции.

70. Способ по любому из вариантов осуществления 67-69, где:

второе селектирование включает обогащение (i) CD4+ Т-клетками, тем самым создавая вторую истощенную популяцию, обогащенную (i) CD57-CD4+ Т-клетками, и где первая входная композиция содержит обогащенные CD57-CD4+ Т-клетки; и

третье селектирование включает обогащение (ii) CD8+ Т-клеток, тем самым создавая третью истощенную популяцию, обогащенную (ii) CD57-CD8+ Т-клетками, и где вторая входная композиция содержит обогащенные CD57-CD8+ Т-клетки.

71. Способ по любому из вариантов осуществления 67-69, где:

второе селектирование включает обогащение (ii) CD8+ Т-клеток, тем самым создавая вторую истощенную популяцию, обогащенную (ii) CD57-CD8+ Т-клетками, и где первая входная композиция содержит обогащенные CD57-CD8+ Т-клетки; и

третье селектирование включает обогащение (i) CD4+ Т-клетками, тем самым создавая третью истощенную популяцию, обогащенную (i) CD57-CD4+ Т-клетками, и где вторая входная композиция содержит обогащенные CD57-CD4+ Т-клетки.

72. Способ стимулирования Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая первую истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец;

(b) проведение второго селектирования на клетках из первой истощенной популяции, где указанное второе селектирование включает обогащение CD3+ Т-клетками из первой истощенной популяции, где обогащение тем самым создает вторую истощенную популяцию обогащенных CD3+ Т-клеток; и

(c) инкубирование одной или более входных композиций в условиях стимулирования, где одна или более входных композиций содержат Т-клетки из второй истощенной популяции.

73. Способ стимулирования Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования на клетках из биологического образца, где первое селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из биологического образца, где обогащение тем самым создает обогащенный биологический образец, обогащенный

CD3+ Т-клетками;

(b) проведение второго селектирования, где второе селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из обогащенного биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где истощенная популяция содержит меньше CD57+ клеток чем обогащенный биологический образец; и

(c) инкубирование одной или более входных композиций в условиях стимулирования, где одна или более входных композиций содержат Т-клетки из истощенной популяции.

74. Способ по любому из вариантов осуществления 60-73, где входная композиция содержит менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток.

75. Способ по любому из вариантов осуществления 60-74, где входная композиция содержит менее чем или примерно 3%, менее чем или примерно 2%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток.

76. Способ по любому из вариантов осуществления 60-75, где частота CD57+ клеток во входной композиции составляет менее чем или примерно 35%, 30%, 25%, 20%, 10%, 5%, 1% или 0,1% от частоты CD57+ Т-клеток, присутствующих в биологическом образце.

77. Способы по любому из вариантов осуществления 60-76, где входная композиция не содержит или по существу не содержит CD57+ Т-клетки.

78. Способ по любому из вариантов осуществления 60-77, где входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD57- Т-клеток.

79. Способ по любому из вариантов осуществления 60-78, где CD4+ Т-клетки во входной композиции содержат, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD57-CD4+ Т-клеток.

80. Способ по любому из вариантов осуществления 60-79, где CD8+ Т-клетки во входной композиции содержат, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD57-CD8+ Т-клеток.

81. Способ по любому из вариантов осуществления 60-80, где CD3+ Т-клетки во входной композиции содержит, по меньшей мере, примерно или примерно 90%, по меньшей мере, примерно или примерно 95%, по меньшей мере, примерно или примерно 97%, по меньшей мере, примерно или примерно 99% или по меньшей мере, примерно или примерно 99,9% CD57-CD3+ Т-клеток.

82. Способ по любому из вариантов осуществления 60-81, где CD57- Т-клетки содержат CD57-CD4+ Т-клетки и CD57-CD8+ Т-клетки.

83. Способ по любому из вариантов осуществления 60-82, где входная композиция имеет отношение от 3:1 до 1:3, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5 или от 1,2:1 до 1:1,2 CD4+ Т-клеток с CD8+ Т-клеткам, все включительно.

84. Способ по любому из вариантов осуществления 60-83, где входная композиция содержит отношение, равное или равное примерно 1:1 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам.

85. Способ по любому из вариантов осуществления 60-84, где частота подобных наивным клеток во входной композиции на, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше чем или примерно частота подобных наивным клеток в биологическом образце.

86. Способ по любому из вариантов осуществления 60-85, где частота одних или более из CD25+ Т-клеток, CD27+ Т-клеток, CD28+ Т-клеток, CCR7+ Т-клеток или CD45RA+ Т-клеток во входной композиции на, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше, чем частота соответствующих клеток в биологическом образце.

87. Способ по любому из вариантов осуществления 60-86, где входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 40% CD27+ Т-клеток.

88. Способ по любому из вариантов осуществления 60-87, где входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 25%, 30%, 35% или 40% CD28+ Т-клеток.

89. Способ по любому из вариантов осуществления 60-88, где входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток.

90. Способ по любому из вариантов осуществления 60-89, где входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток.

91. Способ по любому из вариантов осуществления 20-47, где входная композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20% или 25% CCR7+ Т-клеток.

92. Способы по любому из вариантов осуществления 1-91, где удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца и/или обогащение клеток при первом и/или втором селектировании включает селектирование на основе иммуноаффинности.

93. Способ по варианту осуществления 92, где селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD57, CD4 или CD8, и восстановление клеток, не связанных с антителом, тем самым проводя отрицательное селектирование или восстановление клеток, связанных с антителом, тем самым осуществляя положительное селектирование, где восстановленные клетки истощают CD57+ клетки и/или обогащают CD4+ клетки или CD8+ клетки, и антитело иммобилизовано на магнитной частице.

94. Способ по варианту осуществления 92, где селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, иммобилизованном на

или присоединенным к матрице для аффинной хроматографии, где указанное антитело способно специфически связываться с CD57, CD4 или CD8 для осуществления отрицательного селектирования CD57+ клеток или положительного селектирования CD4+ или CD8+ клеток.

95. Способ по любому из вариантов осуществления 60-94, где условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, где указанный стимулирующий реагент способен активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул.

96. Способ по любому из вариантов осуществления 95, где стимулирующий реагент содержит (i) первичный агент, который специфически связывается с членом TCR комплекса, необязательно, который специфически связывается с CD3, и (ii) вторичный агент, который специфически связывается с Т-клеткой костимулирующей молекулы, необязательно, где костимулирующую молекулу выбирают из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

97. Способ по варианту осуществления 96, где один или оба из первичных и вторичных агентов содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

98. Способ по варианту осуществления 96 или варианту осуществления 97, где первичный агент и вторичный агент содержит антитело, необязательно, где условия стимулирования включают инкубирование с анти-CD3 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, и анти-CD28 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

99. Способ по варианту осуществления 97 или варианту осуществления 98, где антигенсвязывающий фрагмент является одновалентным фрагментом антитела, который выбран из группы, состоящей из Fab фрагмента, Fv фрагмента и одноцепочечного Fv фрагмента (scFv).

100. Способ по любому из вариантов осуществления 96-99, где первичный агент является анти-CD3 Fab, и вторичный агент содержит анти-CD28 Fab.

101. Способ по любому из вариантов осуществления 96-100, где каждый из первичного агента и вторичного агента присутствует или присоединен на поверхности твердой подложки.

102. Способ по варианту осуществления 101, где твердая подложка является или содержит гранулу, необязательно парамагнитную гранулу.

103. Способ по варианту осуществления 102, где условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, содержащего парамагнитную гранулу, с присоединенным на поверхности анти-CD3 и анти-CD28 антитела, где указанный стимулирующий реагент присутствует в отношении менее чем или примерно 3:1 гранул к клеткам.

104. Способ по варианту осуществления 103, где стимулирующий реагент присутствует в отношении равном или равном примерно 1:1 гранул к клеткам.

105. Способы по любому из вариантов осуществления 102-104, дополнительно включающие отделение стимулирующего реагента от клеток, где указанное разделение включает обработку клеток магнитным полем.

106. Способ по любому из вариантов осуществления 96-100, где первичный агент и вторичный агент обратимо связаны на поверхности реагента из олигомерных частиц, содержащих множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина.

107. Способ по варианту осуществления 106, где молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина связываются с или способны связываться с биотином, авидином, аналогом биотина или мутеином биотина, аналогом или мутеином авидина и/или его биологические активным фрагментом.

108. Способ по варианту осуществления 106 или варианту осуществления 107, где молекулы мутеина стрептавидина включают 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: 66.

109. Способ по любому из вариантов осуществления 106-108, где молекулы мутеина стрептавидина включают:

a) последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NOS: 70-73, 78, 85-89;

b) последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, точно или примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к любой из SEQ ID NOS: 70-73, 78, 85-89 и содержит аминокислотную последовательность, соответствующую Val44-Thr45-Ala46-Arg47 или Ile44-Gly45-Ala46-Arg47 и/или обратимо связывается с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом; или

c) функциональный фрагмент a) или b), который обратимо связывается с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом.

110. Способ по любому из вариантов осуществления 106-109, где молекулы мутеина стрептавидина содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 73 или 78.

111. Способ по любому из вариантов осуществления 106-110, где молекулы мутеина стрептавидина содержат последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 73.

112. Способ по любому из вариантов осуществления 106-110, где молекулы мутеина стрептавидина содержат последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 78.

113. Способ по любому из вариантов осуществления 106-112, где каждый из первичного агента и вторичного агента содержит стрептавидин-связывающий пептид.

114. Способ по варианту осуществления 113, где стрептавидин-связывающий

пептид выбран из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 69), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)3-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 70), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)2-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 71) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)2Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 89).

115. Способ по любому из вариантов осуществления 106-114, где первичный агент содержит анти-CD3 Fab, и где вторичный агент содержит анти-CD28 Fab.

116. Способ по любому из вариантов осуществления 106-115, где реагент из олигомерных частиц имеет радиус больше чем или примерно 60 нм, больше чем или примерно 70 нм, больше чем или примерно 80 нм или больше чем или примерно 90 нм.

117. Способ по любому из вариантов осуществления 106-116, где реагент из олигомерных частиц имеет молекулярную массу: по меньшей мере, точно или примерно 5×10^7 г/моль или, по меньшей мере, точно или примерно 1×10^8 г/моль; или от 5×10^7 г/моль и 5×10^8 г/моль, от 1×10^8 г/моль и 5×10^8 г/моль или от 1×10^8 г/моль и 2×10^8 г/моль, все включительно.

118. Способ по любому из вариантов осуществления 106-117, где реагент из олигомерных частиц содержит, по меньшей мере, точно или примерно 500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере, точно или примерно 1000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере, точно или примерно 1500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина или, по меньшей мере, точно или примерно 2000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина; или; от 1000 до 20000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, от 1000 до 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина или от 2000 и 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина.

119. Способ по любому из вариантов осуществления 106-118, дополнительно включающий отделение стимулирующего реагента от клеток, где указанное отделение включает контакт клеток с веществом, где указанное вещество способно обратимо связывать первичные и вторичные агенты и реагент из олигомерных частиц.

120. Способ по варианту осуществления 119, где веществом является свободный партнер связывания и/или является конкурирующий агент.

121. Способ по варианту осуществления 119 или варианту осуществления 120, где присутствие вещества прерывает или снижает сигнал, индуцированный или модулированный первичным или вторичным агентом в Т-клетке.

122. Способ по любому из вариантов осуществления 119-121, где вещество является или содержит стрептавидин-связывающий пептид, биотин или его биологические активный фрагмент или аналог биотина или его биологические активный фрагмент.

123. Способ по любому из вариантов осуществления 119-122, где вещество является или содержит аналог биотина.

124. Способ по варианту осуществления 122, где вещество является или содержит стрептавидин-связывающий пептид, и стрептавидин-связывающий пептид выбран из

группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 69), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)3-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 70), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)2-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 71) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)2Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 89).

125. Способ по варианту осуществления 122, где вещество является или содержит биотин или биологически активный фрагмент или аналог биотина или биологически активный фрагмент.

126. Способ по любому из вариантов осуществления 60-125, где условия стимулирования включают присутствие одного или более рекомбинантных цитокинов.

127. Способ по любому из вариантов осуществления 60-126, где условия стимулирования включают присутствие одного или более рекомбинантных IL-2, IL-7 и IL-15.

128. Способ генетического конструирования Т-клеток, где способ включает введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в популяцию Т-клеток из композиции Т-клеток, полученной способом по любому из вариантов осуществления 1-59, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток.

129 Способ генетического конструирования Т-клеток, где способ включает введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в популяцию Т-клеток из стимулированной Т-клеточной популяции по любому из вариантов осуществления 73-127, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток.

130. Способ по любому из вариантов осуществления 1-127, дополнительно включающий введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор в популяцию Т-клеток, полученную из истощенной популяции или входной композиции или стимулированной популяции, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток.

131. Способ генетического конструирования Т-клеток, где способ включает введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор в стимулированную популяцию Т-клеток, созданную инкубированием Т-клеток входной композиции в условиях стимулирования, если доля CD57+ Т-клеток во входной композиции ниже пороговой доли CD57+ Т-клеток, где порог составляет не более чем точно или примерно 30%, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток.

132. Способ по варианту осуществления 131, где порог составляет не более чем точно или примерно 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1%.

133. Способ генетического конструирования Т-клеток, включающий введение гетерологичный полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, в Т-клетки из входной композиции, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток,

где входная композиция содержит один или более из:

(i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток

(ii) по меньшей мере, точно или примерно 95% CD57- Т-клеток;

(iii) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD4+ Т-клеток; или

(iv) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD8+ Т-клеток.

134. Способ генетического конструирования Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где указанное первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец;

(b) проведение второго селектирования на клетках из истощенной популяции, где указанное второе селектирование включает обогащение одних из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, где обогащение тем самым создает первую обогащенную популяцию, обогащенную одними из (i) CD57-CD4+ Т-клеток и (ii) CD57-CD8+ Т-клеток, и не селектированную популяцию;

(c) проведение третьего селектирования на клетках из не селектированной популяции, где указанное третье селектирование включает обогащение других из (i) CD4+ клеток и (ii) CD8+ клеток из не селектированной популяции, где обогащение тем самым создает вторую обогащенную популяцию, обогащенную другими из (i) CD57-CD4+ Т-клеток и (ii) CD57-CD8+ Т-клеток; и

(d) введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в Т-клетки из одной или обеих из первой и второй обогащенных популяций, тем самым создавая первую и вторую сконструированную популяцию Т-клеток.

135. Способ по любому из вариантов осуществления 130-134, где до введения, входную композицию или обогащенную популяцию инкубируют в условиях стимулирования.

136. Способ по варианту осуществления 134 или варианту осуществления 135, где стадия (d) включает введение гетерологичного полинуклеотида в популяцию клеток, содержащую CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки из первой и второй обогащенных популяций.

137. Способ по варианту осуществления 134 или варианту осуществления 135, где стадия (d) включает раздельное введение гетерологичного полинуклеотида в клетки первой обогащенной популяции и клетки второй обогащенной популяции.

138. Способ по любому из вариантов осуществления 134-137, где:

второе селектирование включает обогащение (i) CD4+ Т-клеток, тем самым создавая первую обогащенную популяцию, обогащенную (i) CD57-CD4+ Т-клетками, и где первая сконструированная популяция содержит CD57-CD4+ Т-клетки; и

третье селектирование включает обогащение (ii) CD8+ Т-клеток, тем самым создавая вторую обогащенную популяцию, обогащенную (ii) CD57-CD8+ Т-клетками, и где вторая сконструированная популяция содержит CD57-CD8+ Т-клетки.

139. Способ по любому из вариантов осуществления 134-137, где:

второе селектирование включает обогащение (ii) CD8+ Т-клеток, тем самым создавая первую обогащенную популяцию, обогащенную (ii) CD57-CD8+ Т-клетками, и где первая сконструированная популяция содержит CD57-CD8+ Т-клетки; и

третье селектирование включает обогащение (i) CD4+ Т-клетками, тем самым создавая вторую сконструированную популяцию, обогащенную (i) CD57-CD4+ Т-клетками, и где вторая входная популяция содержит CD57-CD4+ Т-клетки.

140. Способ генетического конструирования Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец;

(b) проведение второго селектирования на клетках из истощенной популяции, где второе селектирование включает обогащение CD3+ Т-клетками из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, где обогащение тем самым создает первую обогащенную популяцию обогащенных CD57-CD3+ Т-клеток; и

(c) введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в Т-клетки из первой обогащенной популяции, тем самым создавая первую сконструированную популяцию Т-клеток.

141. Способ по варианту осуществления 140, где до введения, первую обогащенную популяцию инкубируют в условиях стимулирования.

142. Способ генетического конструирования Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где первое селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, где обогащение тем самым создает обогащенный биологический образец, обогащенный CD3+ Т-клетками;

(b) проведение второго селектирования на клетках из обогащенного биологического образца, где второе селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из обогащенного биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем обогащенный биологический образец; и

(c) введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в Т-клетки из истощенной популяции, тем самым создавая первую сконструированную популяцию Т-клеток.

143. Способ по варианту осуществления 142, где до введения, истощенную популяцию инкубируют в условиях стимулирования.

144. Способ по любому из вариантов осуществления 134-143, где до введения, клетки одной или обеих первой или второй обогащенных популяций инкубируют в условиях стимулирования.

145. Способ по любому из вариантов осуществления 128-144, где введение

включает трансдукцию с

146. Способ по варианту осуществления 145, где вирусный вектор является гаммаретровирусным вектором или лентивирусным вектором.

147. Способ по варианту осуществления 145 или варианту осуществления 146, где вирусный вектор является лентивирусным вектором.

148. Способ по любому из вариантов осуществления 128-147, дополнительно включающий инкубирование композиции, содержащей трансдуцированные клетки, в течение вплоть до 96 часов после введения, необязательно при температуре точно или примерно 37° ± 2°C.

149. Способ по варианту осуществления 148, где инкубирование проводят в течение вплоть до 72 часов после введения.

150. Способ по варианту осуществления 148, где инкубирование проводят в течение вплоть до 48 часов после введения.

151. Способ по варианту осуществления 148, где инкубирование проводят в течение вплоть до 24 часов после введения.

152. Способ по любому из вариантов осуществления 148-151, где инкубирование дает интеграцию вирусного вектора в геном Т-клетки.

153. Способ по любому из вариантов осуществления 128-147, необязательно дополнительно включающий культивирование клеток сконструированной популяции в условиях, способствующих пролиферации или размножению сконструированных клеток, тем самым создавая размноженную популяцию клеток.

154. Способ по варианту осуществления 153, где культивирование проводят в присутствии одного или более рекомбинантных цитокинов.

155. Способ по варианту осуществления 153, где культивирование проводят в присутствии одного или более рекомбинантных цитокинов, необязательно содержащих один или более IL-2, IL-7 и IL-15.

156. Способ по любому из вариантов осуществления 153-155, где пролиферация или размножение дает примерно или, по меньшей мере, точно или примерно 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное или больше чем или примерно 5-кратное повышение количества жизнеспособных Т-клеток, содержащих гетерологичный полинуклеотид.

157. Способ сбора или получения клеток, где способ включает сбор или получение популяции клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 1-156.

158. Способ генетического конструирования Т-клеток, где способ включает:

(a) инкубирование Т-клеток из истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяция, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции), созданной способом по любому из вариантов осуществления 1-19 в условиях стимулирования, где указанные условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, тем

самым создавая стимулированные Т-клетки; и

(b) введение гетерологичного полинуклеотида в стимулированные Т-клетки, где указанное введение включает трансдуцирование стимулированных Т-клеток с вирусным вектором, содержащим гетерологичный полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток.

159. Способ генетического конструирования Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где указанное первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец;

(b) проведение второго селектирования на клетках из истощенной популяции, где указанное второе селектирование включает обогащение одних из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, где обогащение тем самым создает первую обогащенную популяцию, обогащенную одними из (i) CD57-CD4+ Т-клеток и (ii) CD57-CD8+ Т-клеток, и не селектированную популяцию;

(c) проведение третьего селектирования на клетках из не селектированной популяции, где указанное третье селектирование включает обогащение других из (i) CD4+ клеток и (ii) CD8+ клеток из не селектированной популяции, где обогащение тем самым создает вторую обогащенную популяцию, обогащенную другими из (i) CD57-CD4+ Т-клеток и (ii) CD57-CD8+ Т-клеток;

(d) инкубирование Т-клеток из первой обогащенной популяции и второй обогащенной популяции в условиях стимулирования, где указанные условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, тем самым создавая стимулированные Т-клетки первой и второй обогащенных популяций; и

(e) введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор в стимулированные Т-клетки первой и второй обогащенных популяций, где указанное введение включает трансдуцирование стимулированных Т-клеток вирусным вектором, содержащим гетерологичный полинуклеотид, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток из первой и второй обогащенных популяций.

160. Способ по варианту осуществления 158 или варианту осуществления 159, дополнительно включающий:

(i) культивирование популяции сконструированных Т-клеток в условиях, способствующих пролиферации или размножению сконструированной популяции, тем самым создавая размноженную популяцию Т-клеток; и

(ii) сбор или получение размноженной популяции.

161. Способ по варианту осуществления 159 или 160, где до инкубирования, первая

обогащенная популяция и вторая обогащенная популяция содержит одно или более из:

(i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток

(ii) частоту CD57+ Т-клеток, которая меньше чем или примерно 35% от частоты CD57+ Т-клеток, присутствующих в биологическом образце; или

(iii) по меньшей мере, точно или примерно 95% CD57- Т-клеток.

162. Способ по варианту осуществления 159, где до инкубирования, первая обогащенная популяция и вторая обогащенная популяция содержит менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток.

163. Способ по любому из вариантов осуществления 159-162, где до инкубирования, каждая из первой обогащенной популяции и второй обогащенной популяции содержит менее чем или примерно 3%, менее чем или примерно 2%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток.

164. Способ по любому из вариантов осуществления 159-163, где до инкубирования, частота CD57+ клеток в первой обогащенной популяции и второй обогащенной популяции содержит менее чем или примерно 35%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% или 0,1% от частоты CD57+ Т-клеток в биологическом образце.

165. Способ по любому из вариантов осуществления 159-164, где до введения, первая обогащенная популяция и вторая обогащенная популяция не содержат или по существу не содержат CD57+ Т-клетки.

166. Способ по любому из вариантов осуществления 159-165, где клетки первой обогащенной композиции и второй композиции инкубируют и/или культивируют вместе с одной смешанной популяции.

167. Способ по варианту осуществления 166, где до введения, одна смешанная популяция имеет отношение от 3:1 и 1:3, 2:1 и 1:2, 1,5:1 и 1:1,5 или 1,2:1 и 1:1,2 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам, включительно.

168. Способ по варианту осуществления 166 или варианту осуществления 167, где до введения, одна смешанная популяция содержит отношение в количестве или в количестве примерно 1:1 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам.

169. Способ по любому из вариантов осуществления 159-168, где клетки первой обогащенной популяции и второй обогащенной популяции инкубируют и/или культивируют отдельно.

170. Способ генетического конструирования Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где указанное первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец;

(b) проведение второго селектирования на клетках из истощенной популяции, где указанное второе селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, где обогащение тем самым создает

обогащенную популяцию, обогащенную CD57-CD3+ Т-клетками;

(c) инкубирование Т-клеток из обогащенной популяции в условиях стимулирования, где условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, тем самым создавая стимулированные Т-клетки обогащенной популяции; и

(d) введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в стимулированные Т-клетки обогащенной популяции, где указанное введение включает трансдуцирование стимулированных Т-клеток вирусным вектором, содержащим гетерологичный полинуклеотид, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток из обогащенной популяции.

171. Способ генетического конструирования Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где первое селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, где обогащение тем самым создает обогащенный биологический образец, обогащенный CD3+ Т-клетки;

(b) проведение второго селектирования на клетках из обогащенного биологического образца, где второе селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из обогащенного биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где указанная истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем обогащенный биологический образец;

(c) инкубирование Т-клеток из истощенной популяции в условиях стимулирования, где условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, тем самым создавая стимулированные Т-клетки истощенной популяции; и

(d) введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в стимулированные Т-клетки истощенной популяции, где указанное введение включает трансдуцирование стимулированных Т-клеток вирусным вектором, содержащим гетерологичный полинуклеотид, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток из истощенной популяции.

172. Способ по варианту осуществления 170 или варианту осуществления 171, дополнительно включающий:

(i) культивирование популяции сконструированных Т-клеток в условиях способствующих пролиферации или размножению сконструированной популяции, тем самым создавая размноженную популяцию Т-клеток; и

(ii) сбор или получение размноженной популяции.

173. Способ по любому из вариантов осуществления 158-172, где стимулирующий

реагент содержит парамагнитную гранулу с присоединенными на поверхности анти-CD3 и анти-CD28 антителами.

174. Способ по любому из вариантов осуществления 158-172, где стимулирующий реагент содержит реагент из олигомерных частиц, содержащих множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с обратимо связанными анти-CD3 и анти-CD28 Fab.

175. Способы по любому из вариантов осуществления 159-174, где удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца и/или обогащение клеток при первом и/или втором селектировании включает селектирование на основе иммуноаффинности.

176. Способ по варианту осуществления 175, где селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD57, CD4 или CD8, и восстановление клеток, не связанных с антителом, тем самым проводя отрицательное селектирование или восстановление клеток, связанных с антителом, тем самым осуществляя положительное селектирование, где восстановленные клетки истощены CD57+ клетками и/или обогащены CD4+ клетками или CD8+ клетками, и антитело иммобилизовано на магнитной частице.

177. Способ по варианту осуществления 175, где селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD57, CD3, CD4 или CD8 и восстановление клеток, не связанных с антителом, тем самым проводя отрицательное селектирование или восстановление клеток, связанных с антителом, тем самым осуществляя положительное селектирование, где восстановленные клетки истощены CD57+ клетками и/или обогащены CD3+ клетками, CD4+ клетками или CD8+ клетками, и где антитело иммобилизовано на магнитной частице.

178. Способ по варианту осуществления 175, где селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, иммобилизованным на или присоединенным к матрице для аффинной хроматографии, где указанное антитело способно специфически связываться с CD57, CD4 или CD8 для осуществления отрицательного селектирования CD57+ клеток или положительного селектирования CD4+ или CD8+ клеток.

179. Способ по варианту осуществления 175, где селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, иммобилизованном на или присоединенным к матрице для аффинной хроматографии, где указанное антитело способно специфически связываться с CD57, CD3, CD4 или CD8 для осуществления отрицательного селектирования CD57+ клеток или положительного селектирования CD3, CD4+, CD8+ клеток.

180. Способ по любому из вариантов осуществления 157, 160 или 161-179, где сбор проводят во время или после того, когда сконструированная популяция или размноженная популяция Т-клеток содержит пороговое количество Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток или

пороговую концентрацию Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток.

181. Способ по любому из вариантов осуществления 180, где пороговое количество или концентрация Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток достигается в течение точно или примерно точно или примерно 4, 5, 6 или 7 дней после инициации стимулирования.

182. Способ по любому из вариантов осуществления 181, где для множества популяций сконструированных Т-клеток или популяций размноженных Т-клеток, пороговое количество или концентрация Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток достигается в течение точно или примерно точно или примерно 5 или 6 дней после инициации стимулирования в, по меньшей мере, точно или примерно 70%, 80%, 90% или 95% множества.

183. Способ по любому из вариантов осуществления 180-182, где пороговое количество или концентрация Т-клеток, жизнеспособных Т-клеток, сконструированных Т-клеток или жизнеспособных сконструированных Т-клеток достигается в течение точно или примерно точно или примерно 2, 3, 4 или 5 дупликаций популяций после инициации стимулирования.

184. Способ по любому из вариантов осуществления 80-118, где сконструированная популяция или размноженная популяция содержит менее чем или примерно 3%, менее чем или примерно 2%, менее чем или примерно 1%, менее чем или примерно 0,1% или менее чем или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток.

185. Способ по любому из вариантов осуществления 128-184, где сконструированная популяция или размноженная популяция не содержит или по существу не содержит CD57+ Т-клетки.

186. Способ по любому из вариантов осуществления 128-185, где частота подобных наивным клеток в сконструированной популяции или размноженной популяции составляет, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% клеток в популяции.

187. Способ по любому из вариантов осуществления 128-186, где частота одних или более из CD25+ Т-клеток, CD27+ Т-клеток, CD28+ Т-клеток, CCR7+ Т-клеток или CD45RA+ Т-клеток в сконструированной популяции или размноженной популяции на, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше чем или примерно частоты соответствующих клеток в популяции.

188. Способ по любому из вариантов осуществления 128-187, где сконструированная популяция или размноженная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 40% CD27+ Т-клеток.

189. Способ по любому из вариантов осуществления 128-188, где сконструированная популяция или размноженная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 25%, 30%, 35% или 40% CD28+ Т-клеток.

190. Способ по любому из вариантов осуществления 128-189, где сконструированная популяция или размноженная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток.

191. Способ по любому из вариантов осуществления 128-190, где сконструированная популяция или размноженная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 70% или 80% CD27+CD28+ Т-клеток.

192. Способ по любому из вариантов осуществления 128-191, где сконструированная популяция или размноженная популяция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 10%, 15%, 20% или 25% CCR7+ Т-клеток.

193. Способ по любому из вариантов осуществления 157, 160 или 161-192, где сбор клеток включает удаление клеточного дебриса ополаскиванием или промыванием клеток.

194. Способ по любому из вариантов осуществления 157, 160 или 161-193, где сбор или получение дополнительно включает составление клеток для криоконсервации или введения субъекту.

195. Способ по варианту осуществления 194, где собранные или полученные клетки составляют в присутствии фармацевтически приемлемого эксципиента.

196. Способ по варианту осуществления 194 или варианту осуществления 195, где собранные или полученные клетки составлены для криоконсервации в присутствии криопротектора.

197. Способ по варианту осуществления 196, где криопротектор содержит ДМСО.

198. Способ по любому из вариантов осуществления 129194-197, где собранные или полученные клетки составлены в контейнере, необязательно, флаконе или пакете.

199. Способ по любому из вариантов осуществления 105 или 119-131, где разделение происходит до сбора.

200. Способ по любому из вариантов осуществления 105, 119-131 или 199, где разделение происходит до или во время культивирования.

201. Способ по любому из вариантов осуществления 105, 119-131, 199 или 200, где разделение происходит после введения.

202. Способ по любому из вариантов осуществления 128-201, где рекомбинантный рецептор способен связываться с антигеном-мишенью, который ассоциирован с, является специфическим к и/или экспрессирован на клетке или ткани заболевания, расстройства или состояния.

203. Способ по варианту осуществления 202, где заболеванием, расстройством или состоянием является инфекционное заболевание или расстройство, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или рак.

204. Способ по варианту осуществления 202 или варианту осуществления 203, где антигеном-мишенью является опухолевый антиген.

205. Способ по любому из вариантов осуществления 202-204, где антиген-мишень выбирают из αvβ6 интегрина (avb6 интегрина), антигена созревания В-клетки (BCMA),

B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), антигена рака яичек, антигена рака/яичек 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, C-C мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, протеогликана сульфата хондроитина 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста III типа (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфринB2, эфринового рецептора A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, Fc рецептора подобного 5 (FCRL5; также известного как Fc рецептор гомолог 5 или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатного связывающего белка (FBP), фолатного рецептора альфа, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), erbB димеров, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита B, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), IL-22 рецептора альфа(IL-22Rα), IL-13 рецептора альфа 2 (IL-13Rα2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, L1 молекулы клеточной адгезии (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, члена семейства A содержащего богатые лейцином повторы 8 (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), c-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, члена D группы 2 натуральных киллеров (NKG2D) лигандов, мелана A (MART-1), нервной молекулы клеточной адгезии (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), прогестеронового рецептора, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, трофобласта гликопротеина (TPBG также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), тирозиназа-зависимого белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), тирозиназа-зависимого белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR), рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфического или патоген-экспрессированного антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессированных HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

206. Способ по любому из вариантов осуществления 202-204, где рекомбинантный рецептор является или содержит функциональный не-TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

207. Способ по любому из вариантов осуществления 202-205, где рекомбинантным

рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

208. Способ по любому из вариантов осуществления 202-205 или 207, где рекомбинантным рецептором является анти-BCMA CAR.

209. Способ по любому из вариантов осуществления 202-205 или 207, где рекомбинантным рецептором является анти-CD19 CAR.

210. Способ по любому из вариантов осуществления 202-209, где рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, спейсер и/или шарнирную область, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующую сигнальную область.

211. Способ по варианту осуществления 210, где внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий домен, содержащий scFv.

212. Способ по варианту осуществления 210 или варианту осуществления 211, где внутриклеточный сигнальный домен является или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

213. Способ по любому из вариантов осуществления 210-212, где внутриклеточный сигнальный домен является или содержит внутриклеточный сигнальный домен CD3 цепи, необязательно CD3-дзета (CD3ζ) цепи или его сигнальную часть.

214. Способ по любому из вариантов осуществления 210-213, где костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или его сигнальную часть.

215. Способ идентификации популяции Т-клеток, способных к размножению, где способ включает измерение частоты CD57+ клеток в популяции, где популяция клеток идентифицирована как способная к размножению, если частота CD57+ клеток ниже пороговой частоты.

216. Способ по варианту осуществления 215, где пороговая частота является долей, которая составляет менее чем или примерно 35%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% или 0,1%.

217. Способ по варианту осуществления 215 или варианту осуществления 216, где популяция клеток, способная к размножению, размножается, по меньшей мере, точно или примерно 2-кратно, 4-кратно, 8-кратно или 16-кратно в пределах точно или примерно 4, 5, 6, 7 или 8 дней культивирования в условиях, которые способствуют пролиферации или размножению.

218. Способ определения способности к размножению популяции Т-клеток, где способ включает измерение значения признака, ассоциированного с CD57 экспрессией в популяции Т-клеток, где популяция Т-клеток определена как способная к размножению, если значение признака меньше чем или примерно равно пороговому значению признака.

219. Способ по варианту осуществления 218, где пороговое значение:

i) составляет, составляет примерно или в пределах примерно или примерно 25%, в

пределах примерно или примерно 20%, в пределах примерно или примерно 15%, в пределах примерно или примерно 10% или в пределах примерно или примерно 5% ниже среднего или медианного измерения признака, ассоциированного с CD57 экспрессией и/или ниже одного стандартного отклонения менее чем примерно или примерно среднего или медианного измерения, во множестве эталонных Т-клеточных популяций;

ii) ниже наименьшего измерения признака, ассоциированного с CD57 экспрессией, необязательно в пределах примерно или примерно 50%, в пределах примерно или примерно 25%, в пределах примерно или примерно 20%, в пределах примерно или примерно 15%, в пределах примерно или примерно 10% или в пределах примерно или примерно 5% ниже наименьшего измерения, в популяции из множества эталонных Т-клеточных популяций;

iii) ниже среднего или медианного измерения признака, ассоциированного с CD57 экспрессией, рассчитанного для более чем 65%, 75%, 80%, 85% образцов из множества эталонных композиций Т-клеток;

где множеством эталонных Т-клеточных популяций является множество популяций, которые не размножаются при культивировании в условиях, которые способствуют пролиферации или размножению Т-клеток, необязательно где клетки не размножаются на, по меньшей мере, примерно или примерно 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно или 5-кратно в течение точно или примерно 4, 5, 6, 7 или 8 дней культивирования.

220. Способ по любому из вариантов осуществления 217-219, где признаком является уровень или количество CD57 белка, экспрессированного во всех Т-клетках, CD4+ Т-клетках или CD8+ Т-клетках.

221. Способ по любому из вариантов осуществления 217-220, где признаком является частота, доля или количество CD57+ Т-клеток, CD57+CD4+ Т-клеток или CD57+CD8+ Т-клеток, присутствующих в клеточной популяции.

222. Способ по любому из вариантов осуществления 217-221, где признаком является уровень или количество CD57 иРНК, присутствующих в общих Т-клетках в клеточной популяции.

223. Способ по любому из вариантов осуществления 217-221, где признаком является уровень или количество CD57 иРНК, присутствующих на общих Т-клетках, CD4+ Т-клетках или CD8+ Т-клетках, в клеточной популяции.

224. Способ по любому из вариантов осуществления 217-221, где признаком является уровень или количество доступности хроматина гена, кодирующего CD57 (B3GAT1).

225. Способ по любому из вариантов осуществления 215-224, где способ дополнительно включает измерение второго значения второго признака, ассоциированного экспрессией одного или более вторых генных продуктов в популяции Т-клеток,

где популяция способна к размножению, если значение признака составляет меньше чем или примерно порогового значения признака, и если второе значение второго

признака составляет больше чем или примерно второго порога второго признака.

226. Способ по варианту осуществления 225, где вторым генным продуктом является маркер, ассоциированный с подобными наивным Т-клетками.

227. Способ по варианту осуществления 225 или варианту осуществления 226, где один или более вторых генных продуктов выбирают из CD27, CD28, CCR7 или CD45RA.

228. Способ по любому из вариантов осуществления 225-227, где одним или более вторыми генными продуктами являются CD27 и CD28.

229. Способ по любому из вариантов осуществления 225-228, где второе пороговое значение:

i) составляет, составляет примерно или в пределах примерно 25%, в пределах примерно или примерно 20%, в пределах примерно или примерно 15%, в пределах примерно или примерно 10% или в пределах примерно или примерно 5% выше среднего или медианного измерения признака, ассоциированного с экспрессией второго гена и/или выше одного стандартного отклонения больше чем или примерно среднего или медианного измерения, во множестве вторых эталонных композиций Т-клеток;

ii) составляет выше наибольшего измерения второго признака, ассоциированного с экспрессией второго гена, необязательно в пределах примерно или примерно 50%, в пределах примерно или примерно 25%, в пределах примерно или примерно 20%, в пределах примерно или примерно 15%, в пределах примерно или примерно 10% или в пределах примерно или примерно 5% выше наибольшего измерения в композиции из множества эталонных композиций Т-клеток;

iii) составляет ниже среднего или медианного измерения признака, ассоциированного с экспрессией второго гена, рассчитанного для более чем 65%, 75%, 80%, 85% образцов из множества эталонных композиций Т-клеток.

230. Способ по любому из вариантов осуществления 225-229, где вторым признаком является:

(i) уровень или количество полипептида, кодированного вторым геном, присутствующим в общих Т-клетках, CD4+ Т-клетках или CD8+ Т-клетках;

(ii) уровень или количество полипептида, кодированного вторым геном, присутствующим на поверхности общих Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток;

(iii) признак, которым является частота, доля или количество присутствующих Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток, положительных для экспрессии второго гена;

(iv) уровень или количество иРНК второго гена, присутствующих в Т-клетках; или

(v) уровень или количество доступности второго гена.

231. Способ генетического конструирования Т-клеток, где способ включает:

(a) инкубирование Т-клеток из популяции Т-клеток, идентифицированной или определенной способами по любому из вариантов осуществления 215-230 в условиях стимулирования, где указанные условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, способного активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более

внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул, тем самым создавая стимулированные Т-клетки; и

(b) введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в стимулированные Т-клетки, где указанное введение включает трансдуцирование стимулированных Т-клеток вирусным вектором, содержащим гетерологичный полинуклеотид, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток.

232. Композиция клеток, содержащая CD57- Т-клетки истощенной популяции, полученной способом по любому из вариантов осуществления 1-34.

233. Композиция клеток, содержащая CD57- Т-клетки истощенной популяции, полученной способом по любому из вариантов осуществления 1-59.

234. Композиция по варианту осуществления 233, где клетки содержат CD57-CD4+ Т-клетки.

235. Композиция по варианту осуществления 233, где клетки содержат CD57-CD8+ Т-клетки.

236. Композиция по варианту осуществления 233, где клетки содержат CD57-CD3+ Т-клетки.

237. Композиция обогащенных CD57-CD4+ Т-клеток, содержащая CD57-CD4+ Т-клетки обогащенной популяции CD57-CD4+ Т-клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 12, 13 или 15-34.

238. Композиция обогащенных CD57-CD8+ Т-клеток, содержащая CD57-CD8+ Т-клетки обогащенной популяции CD57-CD8+ Т-клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 13-34.

239. Композиция обогащенных CD57-CD3+ Т-клеток, содержащая CD57-CD3+ Т-клетки обогащенной популяции CD57-CD3+ Т-клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 20-33.

240. Композиция клеток, содержащая популяцию стимулированных Т-клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 35-127.

241. Композиция, содержащая клетки сконструированной популяции Т-клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 128-152.

242. Композиция, содержащая клетки размноженной популяции Т-клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 153-157, 160, 161,163-198 и 202-214.

243. Композиция, содержащая популяцию Т-клеток, идентифицированных или определенных как способные к размножению способом по любому из вариантов осуществления 215-230.

244. Способ лечения субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии заболевания, расстройства или состояния, где способ включает введение субъекту дозы Т-клеток из популяции сконструированных Т-клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 130-151, или размноженной популяции Т-клеток, полученных

способом по любому из вариантов осуществления 154-157, 160, 161,163-198 и 202-214.

245. Способ лечения субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии заболевания, расстройства или состояния, где способ включает введение субъекту дозы Т-клеток из популяции сконструированных Т-клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 128-214.

246. Применение популяции сконструированных Т-клеток полученных способом по любому из вариантов осуществления 128-152 или размноженной популяции Т-клеток полученных способом по любому из вариантов осуществления 153-157, 160, 161,163-198 и 202-214 для лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

247. Применение популяции сконструированных Т-клеток полученных способом по любому из вариантов осуществления 128-152 или размноженной популяция Т-клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 153-157, 160, 161,163-198 и 202-214 для производства лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

248. Применение популяции сконструированных Т-клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 135-174 или композиции по любому из вариантов осуществления 232-244 для лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

249. Применение популяции сконструированных Т-клеток, полученных способом по любому из вариантов осуществления 135-174 для производства лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

250. Композиция по любому из вариантов осуществления 232-244 для применения в лечении заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

251. Применение или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 248-250, где рекомбинантный рецептор, необязательно CAR, специфически распознает или специфически связывается с антигеном, ассоциированным с или экспрессированным на или присутствующим на клетках заболевания или состояния.

252. Применение или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 248-251, где заболеванием или состоянием является рак.

253. Применение или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 248-252, которая является аутологичной для субъекта.

254. Применение или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 248-253, которая является аллогенной для субъекта.

255. Изделие производства, содержащее:

(i) один или более реагентов для селектирования на основе иммуноаффинности клеток, специфических для CD57, CD3, CD4 и/или CD8; и

(ii) инструкции по применению одного или более реагентов для проведения способов по любому из вариантов осуществления 1-245.

256. Изделие производства, содержащее:

(i) один или более реагентов для селектирования на основе иммуноаффинности клеток, специфических для CD57, CD4 и/или CD8;

(ii) один или более стимулирующих реагентов, способных активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул; и

(iii) инструкции по применению одного или более реагентов для проведения способов по любому из вариантов осуществления 1-245.

257. Изделие производства, содержащее:

(i) один или более реагентов для селектирования на основе иммуноаффинности клеток, специфических для CD57 и одного или более из CD3, CD4 и/или CD8;

(ii) один или более стимулирующих реагентов, способных активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул; и

(iii) инструкции по применению одного или более реагентов для проведения способов по любому из вариантов осуществления 1-245.

258. Изделие производства по любому из вариантов осуществления 255-257, где реагент для селектирования на основе иммуноаффинности является или содержит антитело, способное специфически связываться с CD57, CD4 или CD8.

259. Изделие производства по любому из вариантов осуществления 255-257, где реагент для селектирования на основе иммуноаффинности является или содержит антитело, способное специфически связываться с CD57, CD3, CD4 или CD8.

260. Изделие производства по любому из вариантов осуществления 255-259, где реагент для селектирования на основе иммуноаффинности является или содержит антитело, способное специфически связываться с CD57.

261. Изделие производства по варианту осуществления 260, где антитело иммобилизовано на магнитной частице.

262. Изделие производства по варианту осуществления 260, где антитело иммобилизовано на или присоединено к матрице для аффинной хроматографии.

263. Изделие производства по любому из вариантов осуществления 256-262, где стимулирующий реагент содержит (i) первичный агент, который специфически связывается с членом TCR комплекса, необязательно, который специфически связывается с CD3, и (ii) вторичный агент, который специфически связывается с костимулирующей молекулой Т-клетки, необязательно, где костимулирующую молекулу выбирают из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

264. Изделие производства по варианту осуществления 263, где один или оба первичных и вторичных агентов содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

265. Изделие производства по варианту осуществления 263 или варианту осуществления 264, где первичные и вторичные агенты содержат антитело, необязательно где стимулирующий реагент включает инкубирование с анти-CD3 антителом и анти-CD28

антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

266. Изделие производства по любому из вариантов осуществления 263-265, где первичный агент и вторичный агент присутствуют или присоединены на поверхности твердой подложки.

267. Изделие производства по варианту осуществления 266, где твердая подложка является или содержит гранулу, необязательно, парамагнитную гранулу.

268. Изделие производства по любому из вариантов осуществления 263-267, где первичный агент и вторичный агент обратимо связаны на поверхности реагента из олигомерных частиц, содержащего множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина.

269. Изделие производства, содержащее:

(i) композицию по варианту осуществления 241 или варианту осуществления 242; и

(ii) инструкции по введению композиции субъекту.

270. Терапевтическая композиция Т-клеток, содержащая CD4+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где, по меньшей мере, 80% всех рецептор+/CD8+ клеток в композиции являются CD57- и, по меньшей мере, 80% всех рецептор+/CD4+ клеток в композиции являются CD57-

271. Терапевтическая композиция Т-клеток по варианту осуществления 270, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 99%, примерно 100% или 100% клеток в композиции являются CD4+ Т-клетками и CD8+ Т-клетками.

272. Терапевтическая композиция Т-клеток, содержащая CD3+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где, по меньшей мере, 80% всех рецептор+/CD3+ клеток в композиции являются CD57-.

273. Терапевтическая композиция Т-клеток по варианту осуществления 272, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 99%, примерно 100% или 100% клеток в композиции являются CD3+ Т-клетками.

274. Терапевтическая композиция Т-клеток по любому из вариантов осуществления 270-273, где отношение рецептор+/CD4+ Т-клеток к рецептор+/CD8+ Т-клеткам в композиции составляет от примерно 1:3 до примерно 3:1.

275. Терапевтическая композиция Т-клеток по любому из вариантов

осуществления 270-274, где отношение рецептор+/CD4+ Т-клеток к рецептор+/CD8+ Т-клеткам в композиции составляет точно или примерно 1:1.

276. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 270-275, где рекомбинантный белок является или содержит рекомбинантный рецептор, который способен связываться с белком-мишенью, который ассоциирован с, является специфическим к и/или экспрессирован на клетке или ткани заболевания, расстройства или состояния.

277. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 270-276, где рекомбинантным белком является химерный антигенный рецептор (CAR).

278. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 270-277, где количество жизнеспособных Т-клеток в композиции составляет от точно или примерно 10×10^6 клеток и точно или примерно 200×10^6 клеток, необязательно, где количество жизнеспособных Т-клеток в композиции оставляет от точно или примерно 10×10^6 клеток и точно или примерно 100×10^6 клеток, точно или примерно 10×10^6 клеток и точно или примерно 70×10^6 клеток, точно или примерно 10×10^6 клеток и точно или примерно 50×10^6 клеток, точно или примерно 50×10^6 клеток и точно или примерно 200×10^6 клеток, точно или примерно 50×10^6 клеток и точно или примерно 100×10^6 клеток, точно или примерно 50×10^6 клеток и точно или примерно 70×10^6 клеток, точно или примерно 70×10^6 клеток и точно или примерно 200×10^6 клеток, точно или примерно 70×10^6 клеток и точно или примерно 100×10^6 клеток или точно или примерно 100×10^6 клеток и точно или примерно 200×10^6 клеток, все включительно.

279. Терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 270-278, где объем композиции составляет от 1,0 мл до 10 мл, включительно, необязательно, точно или примерно 2 мл, точно или примерно 3 мл, точно или примерно 4 мл, точно или примерно 5 мл, точно или примерно 6 мл, точно или примерно 7 мл, точно или примерно 8 мл, точно или примерно 9 мл или точно или примерно 10 мл или любое значение между любыми из вышеперечисленных.

XI. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1: Оценка вариабельности размножения Т-клеток, жизнеспособности клеток и введения в клеточный цикл во время процесса конструирования Т-клеток

CD8+ Т-клетки получают от семи типовых доноров (доноры A-G) и конструируют для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) с применением производственного процесса, включающего стимулирование, трансдукцию лентивирусным вектором, кодирующим CAR конструкцию и культивирование для размножения, или подвергают аналогичному процессу для стимулирования и культивирования. Размножение клеток, жизнеспособность клеток и введение в клеточный цикл в стимулированных и культивированных клетках оценивают.

Для создания сконструированных клеточных композиций, CD8+ клетки выделяют

из образцов лейкафереза донора-человека с применением обогащения на основе иммуноаффинности и криоконсервируют. Криоконсервированные клеточные композиции затем оттаивают и стимулируют инкубированием клеток в условиях стимулирования в присутствии анти-CD3/анти-CD28 антитела, конъюгированного с парамагнитными гранулами и рекомбинантными цитокинами (например, IL-2, IL-7 и IL-15) в течение приблизительно 24 часов. Клетки из четырех доноров (доноры D-G) затем трансдуцируют вирусным препаратом, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR). После трансдукции, клетки культивируют в присутствии рекомбинантных цитокинов (например, IL-2, IL-7 и IL-15) в инкубаторе при 37 градусов Цельсия, и среду пополняют ежедневно. Клетки от трех доноров (доноров A-C) не подвергают трансдукции и культивируют в присутствии рекомбинантных цитокинов после стимулирования.

Отслеживают общее количество клеток в течение вплоть до приблизительно 240 часов после начала стимулирования, и определяют кратность размножения с течением времени. Оценивают жизнеспособность, и клетки окрашивают маркером, указывающим на деление клеток (Ki-67) и анализируют проточной цитометрией через 72 часа после начала стимулирования.

Как показано на **ФИГ. 1A-1D**, вариабельность размножения Т-клеток (**ФИГ. 1A** и **1B**), жизнеспособность клеток (**ФИГ. 1C**) и введение в клеточный цикл (**ФИГ. 1D**) представлены для CD8+ Т-клеток от разных доноров.

Пример 2: Характеризация CD57+ и CD57- популяций после стимулирования полученных от доноров клеток во время производства клеток

Фенотипы CD57+ и CD57- клеток характеризуют во время типового процесса производства клеток для конструирования клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR).

CD8+ и CD4+ Т-клетки от трех типовых доноров (доноры A-C) подвергают типовому процессу, аналогичному описанному в примере 1, но без трансдукции клеток. Образцы клеток получают непосредственно перед началом и в разные моменты времени во время стимулирования, в течение вплоть до приблизительно 216 часов после начала стимулирования. Клетки окрашивают разными маркерами, включая маркеры, ассоциированные с активацией (CD25 и CD69), пролиферативным потенциалом (CD57), делением клеток (Ki-67) и разными поверхностными маркерами, ассоциированными с фенотипами дифференциации Т-клеток (например, подобных наивным Т-клеток, эффекторных Т-клеток (T_{EFF}), Т-клеток памяти, центральных Т-клеток памяти (T_{CM}), эффекторных Т-клеток памяти (T_{EM}), эффекторных RA Т-клеток памяти (T_{EMRA})), для анализа проточной цитометрией. Анализ иерархической кластеризацией проводят для оценки ассоциации между экспрессией CD57, экспрессией Ki-67 и фенотипами дифференциации Т-клеток.

Как показано на **ФИГ. 2A-2C**, CD57+ Т-клетки присутствуют в популяции в начале стимулирования, и доля CD57+ клеток снижается в популяции во время стимулирования и

культивирования (см. **ФИГ. 2A** и **2B**). Частота CD57+ Т-клеток снижается приблизительно через 48 часов после начала стимулирования, что в общем совпадает с размножением Т-клеток и повышенной жизнеспособностью. После стимулирования, только подмножество CD8+ Т-клеток вступает в клеточный цикл на основе экспрессии Ki-67. Экспрессия Ki-67 значительно не повышается для CD57+ клеток после стимулирования. Для сравнения, доля Ki-67+ клеток значительно увеличивается для CD57- клеток (см. **ФИГ. 2A** и **2C**). В отличие от компартмента CD8+ клеток, среди CD4+ клеток, CD57+ клетки присутствуют на низких уровнях в начале стимулирования, и доля CD57+ клеток повышается к концу процесса стимулирования и культивирования (**ФИГ. 2D**). Эти результаты согласуются с наблюдением, что компартмент CD8+ клеток может быть более гомогенным, чем компартмент CD4+ клеток.

Примечательно, полученные от донора композиции демонстрируют вариабельность в течение времени, требуемого для достижения типового порогового количества клеток для сбора (критерия сбора), который соответствует вариабельности в экспрессии разных иммунофенотипических маркеров. Одна полученная от донора композиция требует только 7 дней культивирования для достижения критерия сбора. Напротив, другая полученная от донора композиция требует 8 дней культивирования для достижения критерия сбора. Анализ экспрессии CD57, Ki-67, CD45RA и CD27 (по данным проточной цитометрии) между двумя донорными композициями показан на **ФИГ. 2E** и **2F**. Экспрессию анализируют, начиная с момента времени t=0, которое представляет время непосредственно до стимулирования. Как показано на **ФИГ. 2E**, во все оцениваемые моменты времени, значительно более высокую экспрессию CD57 наблюдают в донорной клеточной композиции, которая требует 8 дней для достижения критерия сбора («8д до сбора»), по сравнению с донорной клеточной композицией, которая требует 7 дней для достижения критерия сбора («7д до сбора»). Как показано на **ФИГ. 2F**, во все оцениваемые моменты времени, клетки из композиции, требующей 7 дней демонстрируют более высокую частоту CD27+CD45RA+, по сравнению с клетками из композиции, требующей 8 дней. Клетки из композиции, требующей 8 дней демонстрируют значительно меньшую частоту CD27+ клеток во все оцениваемые моменты времени. Эти наблюдения согласуются с открытием, что клеточные композиции, демонстрирующие более высокую частоту CD27+ клеток в исходном материале, демонстрируют лучшее размножение и более высокую частоту таких клеток в конце процесса культивирования.

Как показано на **ФИГ. 3A**, наблюдают, что CD57+ Т-клетки экспрессируют маркеры, являющиеся показателями активации (CD69 и CD25) после стимулирования. CD57+ клетки демонстрируют фенотипы, ассоциированные с активацией и сохраняются на ранних стадиях процесса. Анализ иерархической кластеризацией показал, что CD57+ и Ki67- Т-клетки демонстрируют фенотипические характеристики, ассоциированные с более дифференцированными эффекторными клеточными популяциями (**ФИГ. 3B**), по сравнению с CD57- и Ki67+ клетками (**ФИГ. 3C**). Ki-67+ популяции первично

включенных клеток, которые были CD27+CD28+ и Ki67- популяциями, были обогащены CD57+ клетками и соответствовали CD27-CD28-фенотипам.

Результаты согласуются с наблюдением, что CD57+ Т-клетки, будучи способными к стимулированию, демонстрируют фенотипы, ассоциированные с более терминально дифференцированными клетками и пониженным пролиферативным потенциалом. В некоторых аспектах, наблюдают, что CD27+ Т-клетки вносят вклад в большинство размноженных клеток во время производства CAR Т-клеток. Для сравнения, CD57+ Т-клетки не размножаются и вносят минимальный вклад в клетки в конечных произведенных CAR композициях Т-клеток. В некоторых аспектах, присутствие CD57+ клеток в клеточной популяции, которая может демонстрировать пониженный пролиферативный потенциал, может вносить вклад в вариации и гетерогенность в клеточных популяциях, участвующих процессе производства Т-клеток.

Пример 3: Частота CD57+ клеток во входной композиции и влияние на размножение клеток, жизнеспособность, стимулирующие реагенты и цитокины

Входные композиции, содержащие донор-совпадающие CD57+ и CD57- клетки смешивают в определенных отношениях и подвергают типовому производственному процессу. Размножение клеток и жизнеспособность клеточных композиций оценивают.

CD57+CD8+ Т-клетки и CD57-CD8+ Т-клетки выделяют из композиции CD8+ Т-клеток, полученной от донора положительным селектированием CD57+ клеток с применением обогащения на основе иммуноаффинности. Чистоту выделенных популяций определяют проточной цитометрией. Для оценки влияния разных частот CD57+ Т-клеток на производственный процесс, входные композиции, содержащие следующую частоту CD57+ клеток, создают смешиванием выделенных CD57+ и CD57- популяций, до стимулирования: (1) 100% CD57+ клеток; (2) 75% CD57+ клеток; (3) 25% CD57+ клеток; и (4) 0% CD57+ клеток. Разные титрованные входные композиции подвергают типовому производственному процессу для CAR-экспрессирующих Т-клеток, аналогично описанному в примере 1, включая стимулирование инкубированием с анти-CD3/анти-CD28 конъюгированными гранулами и рекомбинантными цитокинами и трансдукцию с вирусным препаратом, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR. Отслеживают общее количество клеток и жизнеспособность во времени в течение вплоть до приблизительно 288 часов после начала стимулирования. Изображения лунок планшетов для культивирования клеток получают через 48 часов после начала стимулирования и оценивают кластеризацию клеток в присутствии стимулирующего реагента. Концентрацию IL-2 в культуральной среде оцениваю через 24 и 48 часов после начала стимулирования.

Как показано на **ФИГ. 4А**, входные композиции, содержащие более высокие частоты CD57+ клеток, демонстрируют более медленное размножение клеток, требуют более длительного культивирования для достижения типового порогового количества клеток для сбора (критерий сбора) и демонстрируют меньшую жизнеспособность клеток, по сравнению с входными композициями, содержащими меньшие частоты CD57+ клеток.

Очень низкое или отсутствие размножения наблюдают в композиции, содержащей 100% CD57+ клеток. В общем, наблюдается, что частота CD57+ клеток во входной композиции ассоциирована с длительностью культивирования, требуемого для достижения критерия сбора. Как показано на **ФИГ. 4B**, входные композиции, содержащие более высокие частоты CD57+ клеток, также образуют клеточные кластеры в присутствии стимулирующего реагента (анти-CD3/анти-CD28 антитело, конъюгированное с парамагнитными гранулами) в течение 48 часов, демонстрируя, что клетки более чувствительны к стимулированию. Наблюдают, что через 24 и 48 часов после начала стимулирования, концентрация IL-2 в культуральной среде была ниже в культурах входных композиций, содержащих большие частоты CD57+ клеток, по сравнению с культурами входных композиций, содержащими меньшие частоты CD57+ клеток (**ФИГ. 4C**).

Результаты согласуются с наблюдением, что частота CD57+ клеток во входной композиции может влиять на общее размножение клеток и жизнеспособность клеток. Входные композиции с более высокими частотами CD57+ клеток требует более длительного культивирования для достижения критерия сбора. В некоторых аспектах наблюдали, что CD57+ клетки, которые были способны к стимулированию и занятию или применению стимулирующих реагентов, потребляют IL-2, присутствующий в условиях культивирования и вносят вклад в количество клеток в культуре. Это показывает, что присутствие CD57+ клеток может влиять на другие клетки в популяции во время производственного процесса.

Пример 4: Истощение CD57+ клеток во входной композиции и действие на длительность культивирования

Входные композиции с истощенными CD57+ клетками подвергают типовому производственному процессу и оценивают фенотипы клеток и длительность культивирования до достижения критерия сбора.

CD8+ клетки получают от четырех разных субъектов, и каждую разделяют на две группы. В одной группе, CD57+ клетки истощают из клеточной композиции для создания входной композиции (истощенной) и чистоту оценивают проточной цитометрией. В другой группе, CD8+ клетки применяют в качестве входной композиции без истощения CD57+ клеток (неистощенные). Истощенные и не истощенные входные композиции подвергают типовому производственному процессу для CAR-экспрессирующих Т-клеток через вирусную трансдукцию, аналогично описанному в примере 1, включая стимулирование инкубированием с анти-CD3/анти-CD28 конъюгированными гранулами и рекомбинантными цитокинами, трансдукцию с вирусным препаратом, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, и культивирование в условиях размножения. Непосредственно перед началом стимулирования, образцы клеточных композиций окрашивают для Ki67, CD3, CD57, CD27 и CD28. Длительность культивирования истощенных и не истощенных культур до достижения типового критерия сбора оценивают. Критерий сбора определен как приблизительно 10-кратное размножение

клеток.

Как показано на **ФИГ. 5A**, не истощенные входные композиции демонстрируют варьирующуюся частоту CD57 клеток. Как показано на **ФИГ. 5B**, частота CD27+ CD28+ клеток была выше и более согласующейся для истощенных входных композиций, по сравнению с не истощенными входными композициями. Диаграммы проточной цитометрии для экспрессии CD27 для четырех донорных не истощенных и истощенных входных композиций показаны на **ФИГ. 5C**. Верхняя панель **ФИГ. 5C** показывает, что CD8+ Т-клетки из не истощенных образцов от четырех доноров демонстрируют разные степени экспрессии CD27. Наоборот, как показано на нижней панели **ФИГ. 5C**, истощенные CD8+CD57+ клетки из входных композиций улучшают консистентность исходного материала для доноров, что подтверждается аналогично согласующейся экспрессией CD27. Вместе, эти результаты демонстрируют вариабельность в подобных наивным или центральных памяти клетках для донорных клеток в исходных донорных образцах лейкафереза, которая может быть улучшена истощением CD57+ клеток.

Экспрессию Ki67, маркера пролиферации и роста Т-клеток, оценивают для общих CD3+ Т-клеток в донорных входных композициях через 72 часа после начала стимулирования. Как показано на **ФИГ. 5D**, экспрессия Ki67 была выше для истощенных входных композиций, по сравнению с не истощенными композициями.

Как показано на **ФИГ. 5E**, длительность культивирования до сбора (от начала стимулирования до времени достижения критерия сбора) в общем была меньше и более согласованной для истощенных входных композиций, по сравнению с не истощенными входными композициями. Размножение клеток от одного типового донора, по данным общего количества Т-клеток в разные дни после стимулирования, показано на **ФИГ. 5F**. Результаты показывают, что общее количество клеток, размноженное из истощенных входных композиций, выше, чем общее количество клеток, размноженных из не истощенных входных композиций, во множество моментов времени после стимулирования (**ФИГ. 5F**). Эти открытия согласуются с наблюдением, что истощенные популяции могут демонстрировать меньшую длительность до критерия сбора из-за большего количества делящихся и общих клеток.

После трансдукции истощенных и не истощенных клеток с типовым химерным антигенным рецептором (CAR), оценивают долю клеток, экспрессирующих CAR. Как показано на **ФИГ. 5G**, доля клеток, экспрессирующих CAR в истощенных донорных композициях была более консистентной, чем доля клеток, экспрессирующих анти-CD19 CAR в не истощенных донорных композициях. Этот результат согласуется с наблюдением, что истощение CD57+ клеток может улучшить консистентность экспрессии CAR Т-клетками.

Вместе эти результаты согласуются с наблюдением, что селектированное истощение CD57+ клеток улучшает размножение и снижает длительность культивирования, требуемую для достижения критерия сбора. Далее, открытия показывают, что истощение CD57+ клеток может снизить вариабельность фенотипа

клеток в исходном материале (например, CD27+ клетках) среди разных входных композиций. В некоторых аспектах, вариабельность в присутствии и частоте CD57+ Т-клеток среди разных входных композиций может влиять на процесс производства CAR Т-клеток, и может привести к вариабельности в длительности культивирования и признаков клеточной композиции. В некоторых аспектах, истощение CD57+ Т-клеток во входной композиции может улучшить контроль процесса и консистентность произведенных композиций CAR Т-клеток.

Пример 5: Частота CD57+CD8+ Т-клеток в периферической крови пациентов с неходжкинской лимфомой (NHL)

Клетки периферической крови пациентов с неходжкинской лимфомой (NHL) оценивают на экспрессию CD57+ и разные поверхностные маркеры, ассоциированные с фенотипами дифференциации Т-клеток.

Разные композиции CD4+ и CD8+ клеток из образцов лейкафереза от пациентов с NHL в клиническом исследовании выделяют обогащением на основе иммуноаффинности и криоконсервируют. Клетки из каждый выделенной клеточной композиции затем размораживают и стимулируют отдельным инкубированием клеток в условиях стимулирования в присутствии анти-CD3/анти-CD28 антитела, конъюгированного с парамагнитными гранулами, и рекомбинантных цитокинов (например, IL-2, IL-7 и IL-15) в течение 48 часов. Через 48 часов после начала стимулирования, образцы из клеточных композиций окрашивают для разных маркеров для анализа проточной цитометрией, включая маркеры, ассоциированные с клеточными линиями (CD4 и CD8), пролиферативным потенциалом (CD57), делением клеток (Ki-67) и фенотипами дифференциации Т-клеток (например, подобных наивным Т-клеток, эффекторных Т-клеток (T_{EFF}), Т-клеток памяти, центральных Т-клеток памяти (T_{CM})). Иерархическую кластеризацию проводят для оценки ассоциации между экспрессией CD57+ и множеством маркеров, ассоциированных с фенотипами дифференциации Т-клеток.

Как показано на **ФИГ. 6А**, частота CD57+ клеток во входной композиции варьируется для CD8+ клеток от разных пациентов с NHL. Как показано на **ФИГ. 6В**, общее обратное отношение между долей CD57+CD8+ клеток и долей Ki67+ клеток наблюдается через 48 часов после начала стимулирования. Как показано на **ФИГ. 6С**, иерархическая кластеризация показала кластеры, которые разделены фенотипами дифференциации Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток, и эти фенотипические кластеры дополнительно кластеризуют образцы с либо высоко, либо низкой частотой CD57+ Т-клеток.

Анализ CD57+ клеток из донорных входных композиций показал, что экспрессия Ki67 варьируется в клетках с разными иммунофенотипами дифференциации Т-клеток. Как показано на **ФИГ. 6D**, доля живых CD57+ клеток, экспрессирующих Ki67, была наименьшей в CD27-CD45RA+ клетках, и была наибольшей в CD27-CD45RA- клетках, CD27+CD45RA+ и CD27+CD45RA- клетках.

Для разделения CD4+ и CD8+ донорных клеточных композиций анализируют на

экспрессию Ki67, CD27, CD45RA и CD57. Как показано на **ФИГ. 6E**, значительную долю CD8+CD57+ клеток составляют CD27-CD45RA+, показывая, что эти Т-клетки являются терминально-дифференцированными эффекторными RA Т-клетками памяти (TEMRA). Высокую долю CD4+CD57+ клеток составляли CD27-CD45RA-, соответствуют тому, что эти клетки являются эффекторными Т-клетками памяти (EM). Эти открытия демонстрируют, что CD57+ Т-клетки являются дифференцированными эффекторными Т-клетками разных иммунофенотипов.

Результаты согласуются с наблюдениями вариабельных частот CD57+ Т-клеток в периферическом кровотоке у субъектов с NHL. Аналогично открытиям, сделанным для клеточных композиций, созданных из донорных клеток (как описано в предыдущих примерах), наблюдается, что высокая экспрессия CD57 ассоциирована с фенотипами, характерными для более дифференцированных клеток с пониженным пролиферативным потенциалом.

Пример 6: Взаимосвязь между количеством дупликаций и дифференциацией клеток с ответом пациента

Создают типовые терапевтические композиции Т-клеток, содержащие аутологичные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), специфический для CD19. Анти-CD19 CAR содержит анти-CD19 scFv, полученные из антитела мыши (вариабельную область, полученную из FMC63), полученный из иммуноглобулина спейсер, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую область, полученную из 4-1BB и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета.

Для создания клеточных композиций для введения субъектам с рецидивирующей и рефрактерной неходжкинской лимфомой (NHL), аутологичные клетки выделяют из субъектов через лейкаферез. Образцы лейкафереза подвергают обработке для создания CAR-экспрессирующих Т-клеток. Процесс включает промывание клеток с применением автоматизированной промывки и селектирования на основе иммуноаффинности для очистки $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, с получением двух композиций, обогащенных $CD8^+$ (в которых медиана 99%, интерквартильный интервал (IQR) 98-100%, клеток были $CD8^+$) и $CD4^+$ (в которых медиана 99%, IQR 99-100%, клеток были $CD4^+$) клеток, соответственно.

Клетки обогащенных $CD4^+$ и $CD8^+$ композиций активируют с анти-CD3/анти-CD28 парамагнитными гранулами и отдельно подвергают лентивирусной трансдукции с вектором, кодирующим анти-CD19 CAR с 4-1BB костимулирующим доменом. CAR содержит анти-CD19 scFv, полученный из антитела мыши, иммуноглобулиновый спейсер, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую область, полученную из 4-1BB и CD3-дзета внутриклеточный сигнальный домен. Трансдуцированные популяции затем отдельно инкубируют в присутствии рекомбинантных IL-2 и IL-15 цитокинов (и, дополнительно, рекомбинантного IL-7 для CD4+ композиции Т-клеток) для размножения клеток. Инкубирование в условиях размножения проводят в биореакторе с колебательным движением до достижения порога примерно 4-кратного размножения.

Размноженные $CD8^+$ и $CD4^+$ клетки составляют и криоконсервируют отдельно и хранят до введения. Для минимизации вариаций между партиями и/или клеточными композициями, полученными от разных пациентов, таких, которые имеют разные характеристики пациентов, в параметрах, указывающих на здоровые клетки, клетки хранят в постоянных объемах для разных партий. Клеточные продукты демонстрируют узкий интервал концентраций жизнеспособных клеток (на основе оценки клеточных композиций для одной группе субъектов, $CD8^+$: медиана 31×10^6 клеток/мл, IQR $28\text{-}40\times10^6$ клеток/мл, N=38; $CD4^+$: медиана 35×10^6 клеток/мл, IQR $31\text{-}40\times10^6$, N=36).

Созданные композиции Т-клеток применяют для введения субъектам с рецидивирующей и рефрактерной неходжкинской лимфомой (NHL) как описано ниже.

А. Типовые признаки терапевтических Т-клеточных композиций

Созданные терапевтические композиции Т-клеток, применяемые для введения субъектам с рецидивирующей и рефрактерной неходжкинской лимфомой (NHL), описанные ниже, оценивают на CCR7 и CD27 с применением проточной цитометрии. Уровни поверхностной экспрессии CD4 и усеченного рецептора, применяемого в качестве суррогатного маркера, также оценивают.

Для каждой созданной терапевтической композиции, количество дупликаций созданных клеточных композиций также определяют на основе общего количества ядер (TNC) клеток, с применением двухцветового флуоресцентного окрашивания акридиновым оранжевым (AO) и либо йодидом пропидия (PI), либо DAPI, с применением следующей формулы:

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

На **ФИГ.** 7 показана корреляция между количеством дупликаций в процессе получения терапевтической композиции и долей CD27+ клеток из CD4+CAR+ клеток. Аналогичные результаты получают для CD8+ Т-клеток. Результаты показывают, что, в общем, меньшее количество дупликаций во время процесса создания терапевтической композиции Т-клеток ассоциировано с повышенными уровнями CD27+ клеток. Не желая быть связанными теорией, результаты согласуются с наблюдением, что на повышенную долю CD27+ клеток в процессе получения сконструированных Т-клеток могут влиять ограниченные дупликации в процессах.

Исследования моделирования плотности посева внутри процесса во время стадии размножения в процессе по существу таком же, как описано выше, демонстрируют, что относительно высокая плотность посева (*например,* 0,35×10^6 клеток/мл или больше) предположительно снизит количество дупликаций популяций для достижения критерия сбора по сравнению с более низкой плотностью посева (*например*, 0,05×10^6 клеток/мл или ниже (**ФИГ. 8А**). Моделирование также показало, что более высокая плотность посева (**ФИГ. 8В**) или меньшая длительность процесса (**ФИГ. 8С**) также предположительно вызывает повышение доли CD8+CAR+ Т-клеток, положительных для

CD27 в выходной терапевтической композиции Т-клеток (*например*, лекарственном продукте) по сравнению с более низкой плотностью посева или большей длительностью процесса, соответственно. Эти данные согласуются с открытием, что более высокая плотность посева клеток в начале стадии размножения или меньшая длительность процесса может вызвать увеличение доли центральных клеток памяти в сконструированной терапевтической композиции Т-клеток.

B. Введение анти-CD19 CAR+ Т-клеточной композиции

Терапевтические CAR^+ композиции Т-клеток, описанные выше, вводят субъектам с рецидивирующей или рефрактерной (R/R) агрессивной неходжкинской лимфомой (NHL) в клиническом исследовании. Более конкретно, когорте взрослых людей с R/R NHL, включая диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), впервые диагностированную или трансформированную из вялотекущей лимфому (NOS), высокозлокачественную В-клеточную лимфому (включая двойное/тройное воздействие), DLBCL, трансформированную из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) или лимфом маргинальной зоны (MZL), первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому (PMBCL) и фолликулярную лимфому 3b степени (FLG3B), водят анти-CD19 CAR-экспрессирующие композиции Т-клеток. Результаты отдельно оценивают для центрального подмножества субъектов в пределах полной когорты (за исключением тех субъектов, которые имеют плохое общее состояние (ECOG 2), DLBCL, трансформированной из лимфом маргинальной зоны (MZL) и/или хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL, Рихтер) и за исключением тех субъектов, которые имеют первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому (PMBCL) и фолликулярную лимфому 3b степени (FLG3B) (центральная когорта)). Центральная когорта включает субъектов с DLBCL, NOS и трансформированной фолликулярной лимфомой (tFL) или высокозлокачественной В-клеточной лимфомой (двойное/тройное воздействие) или высокозлокачественной В-клеточной лимфомой с MYC и BCL2 и/или BCL6 перестановками с DLBCL гистологией (двойное/тройное воздействие) и с показателем общего состояния Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG PS) 0 или 1. Анализ в момент времени, представленный в этом примере, основан на оценке всего 91 субъектов в полной когорте (88 (65 из когорты CORE) оцениваемых на ответ, и 91 (67 из когорты CORE), оцениваемых на безопасность), которым вводили анти-CD19 CAR-экспрессирующие Т-клетки.

Криоконсервированные клеточные композиции, содержащие анти-CD19 CAR-экспрессирующие Т-клетки, размораживают для внутривенного введения. Терапевтическую дозу Т-клеток вводят в виде определенной клеточной композиции через введением составленной $CD4^+$ CAR^+ клеточной популяции и составленной $CD8^+$ CAR^+ популяции, отдельно вводимых в целевом отношении приблизительно 1:1. Субъектам вводят одинарную или двойную дозу CAR-экспрессирующих Т-клеток (каждую отдельную дозу через раздельные инфузии $CD4^+$ CAR-экспрессирующих Т-клеток и $CD8^+$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, соответственно) следующим образом: одну дозу с

уровнем дозы 1 (DL1), содержащую 5×10^7 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток или одну дозу с уровнем дозы 2 (DL2), содержащую 1×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток. В некоторых случаях, субъектам вводят двойную дозу DL1, где каждую дозу вводят с интервалом приблизительно четырнадцать (14) дней, вводимую в 1 день и 14 день, включая одного субъекта, который непреднамеренно получил две DL2 дозы по схеме двойного дозирования, из-за ошибки дозирования. Уровень дозы и целевые количества подмножеств Т-клеток для введенной композиции в DL1 и DL2 указанны в **Таблице Е1**. В центральной когорте, 34 субъектам вводят DL1 и 27 субъектам вводят DL2.

Таблица Е1. Целевые уровни доз и количество подмножеств Т-клеток для клеточных композиций, содержащих анти-CD19 CAR Т-клетки

Уровень дозирования	**Доза хелперных Т-клеток (T_H) ($CD4^+CAR^+$)**	**Доза цитотоксических Т-клеток (T_C) ($CD8^+CAR^+$)**	**Доза общих Т-клеток ($CD3^+$ CAR^+)**
1	25×10^6	25×10^6	50×10^6
2	50×10^6	50×10^6	100×10^6

В **таблице Е2** показан общий ответ и результаты безопасности для полной когорты и центральной когорты для двух уровней дозирования. Частота объективных ответов (ORR) составляла 74%, включая 52% субъектов, которые показали полный ответ (CR). Количество случаев синдрома высвобождения цитокинов (CRS) любой степени составляет 35%, при 1% тяжелого CRS; и количество случаев нейротоксичности (NT) любой степени составляет 19%, при 1% тяжелой NT.

Таблица Е2. Ответ и безопасность после ведения CAR^+ клеток

	ВСЯ	**ЦЕНТРАЛЬНАЯ**		
	Все уровни доз	**Все уровни доз[a]**	**DL1**	**DL2**
Наилучший общий ответ (BOR), n[b]	88	65	34	27
ORR, % (95% CI)	74 (63,83)	80(68, 89)	77 (59,89)	82 (62, 94)
CR, % (95% CI)	52 (41,63)	55(43, 68)	47 (30, 65)	63 (42, 81)
Безопасность, n[c]	91	67	34	29
Любой CRS, % (95% CI)	35 (25, 46)	36 (24, 48)	41 (25, 59)	24 (10, 44)
sCRS (степень 3-4), % (95% CI)	1 (0, 6)	1 (0, 8)	38 (0, 15)	0
Любая NT, % (95% CI)	19 (11,28)	21 (12, 33)	24 (11, 41)	17 (6, 36)
sNT (степень 3-4), % (95% CI)	12 (6, 21)	15 (7, 26)	21 (9, 38)	7 (1, 23)

[a] Четыре пациента леченных DL1D (уровень дозы 1, схема двойного дозирования) с одинаковыми результатами.

[b] Включает пациентов с событием PD, смерти или 28-дневными сканами при проведении повторного исследования. Один пациент не имеет доступных сканов при проведении повторного исследования.

[c] Включает всех субъектов, которые получили, по меньшей мере, одну дозу соответствующего CAR-экспрессирующего клеточного продукта за 28 дней до даты фиксации данных или умерли.

C. Связь между клеточными признаками анти-CD19 CAR-экспрессирующих Т-клеток и ответом

Оценивают связь между определенными фенотипическими признаками CAR^+ Т-клеток в терапевтических композициях и параметрами, ассоциированными с клиническим ответом. Наблюдают корреляцию между фенотипом памяти в композиции и функцией, транслированную в положительную корреляцию между подмножеством композиций центральной памяти и пиком in vivo размножения CAR^+ клеток (ρ=0,42, P=0,002) и выживанием без прогрессирования (PFS) (оценка выживаемости Каплана-Мейера, P=0,0164). На **ФИГ. 9A-9D** показаны кривые выживания Каплана-Мейера для субъектов, которым вводили CAR^+ композиции Т-клеток, деленных на группы, которые получали композиции, содержащие частоту $CCR7^+CD27^+$ CAR^+ Т-клеток среди $CD4^+$ CAR^+ Т-клеток (**ФИГ. 9A** для выживания без прогрессирования, **ФИГ. 9C** для длительности ответа) и среди $CD8^+$ CAR^+ Т-клеток (**ФИГ. 9B** для выживания без прогрессирования, **ФИГ. 9D** для длительности ответа), которая выше или ниже определенного порогового уровня. Наблюдается, что более высокая частота $CCR7^+CD27^+$ клеток памяти в композиции коррелирует с более длительным выживанием без прогрессирования.

Однофакторный анализ показал обратную корреляцию между дупликациями Т-клеточных популяций (PDL) во время процесса получения терапевтической композиции Т-клеток и вероятностью выживания без прогрессирования (PFS) у пациентов с неходжкинской лимфомой (NHL). На **ФИГ. 10** показана кривая PFS на основе лог-рангового критерия с оптимальным разделением с «высоким» (>6 PDL) или «низким» (<6 PDL) количеством PDL в CD8+/CAR+ Т-клетках. Этот результат согласуется с открытием, что факторы, которые могут ограничивать количество дупликаций популяций Т-клеток в процессе получения терапевтической композиции Т-клеток может улучшать вероятность выживания без прогрессирования у субъектов, которое является устойчивым.

Пример 7: Оценка характеристик селектированных (входной) клеточных композиций в процессе получения терапевтической клеточной композиции.

Оценивают фенотипические признаки Т-клеток, селектированных от субъектов с рецидивирующей и рефрактерной неходжкинской лимфомой (NHL), до конструирования с анти-CD19 CAR способом, описанным в 6. $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки селектируют обогащением на основе иммуноаффинности из лейкафереза мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека из множества субъектов. Композицию таких

селектированных Т-клеток (до генетического конструирования, обозначенную «композиция до конструирования») оценивают на экспрессию маркеров клеточной поверхности, указывающих на определенные подтипы Т-клеток, такие как подтипы эффекторных клеток памяти и центральных клеток памяти, включая С-С хемокиновый рецептор типа 7 (CCR7), CD27 и CD45RA. Также оценивают поверхностную экспрессию CD4 или CD8.

Оценка обогащенных CD4+ и CD8+ композиций (например, входных композиций) показала, что доля Т-клеток, положительных для подобных наивным маркеров (например, CD27+CD28+ Т-клеток), таких как присутствуют на подмножествах центральных Т-клеток памяти, была высоко вариабельной между пациентами с NHL (**ФИГ. 11)**. Эти данные показывают, что межиндивидуальная Т-клеточная гетерогенность подмножеств центральных Т-клеток памяти существует в селектированных (входных) композициях Т-клеток, применяемых для создания CAR+ Т-клеточных терапевтических композиций Т-клеток.

Селектированные (входные) композиции Т-клеток применяют для создания CD4+ и CD8+ терапевтических композиций Т-клеток по существу как описано в примере 6. Количество дупликаций созданных клеточных композиций также определяют на основе общего количества ядер (TNC) клеток, как описано в примере 6. Определяют корреляцию между фенотипическими признаками клеток в селектированной (входной) композиции Т-клеток и количеством дупликаций в процессе получения терапевтической композиции. Как показано на **ФИГ. 12,** более высокая доля эффекторных CD4+Т-клеток памяти, идентифицированная отрицательным окрашиванием для CD45RA и CCR7 (CD45RA-CCR7-) в обогащенных CD4+ (входных) композициях коррелирует положительно с количеством дупликаций популяции во время получения терапевтической композиции Т-клеток. Аналогичный результат наблюдают для CD8+ Т-клеток.

Представленные выше результаты поддерживают подход, который включает снижение доли эффекторных Т-клеток памяти и/или обогащение Т-клеток, положительных для маркеров подмножеств подобных наивным клеток или центральных клеток памяти во входной композиция, применяемой для получения сконструированной композиции Т-клеток. В соответствии с полученными выше результатами, такой подход может улучшить один или более признаков сконструированной терапевтической композиции Т-клеток, например, снизить межличностную вариабельность, снизить количество дупликаций популяции в процессе получения сконструированной терапевтической композиции Т-клеток и/или повысить вероятность того, что субъект будет демонстрировать устойчивое PFS.

Пример 8: Кинетика процессов конструирования без размножения и с размножением

Т-клетки человека (CD4+ и CD8+) конструируют с химерным антигенным рецептором (CAR) с применением множества производственных процессов, включая процессы, которые не включают стадию культивирования для размножения (когорта без

размножения) и процессы, которые включают стадию культивирования для размножения (когорта с размножением). Проводят полный анализ клеток, полученных во время и после производства с применением разных процессов. Производство для получения сконструированных композиций Т-клеток включает масштабированные прогоны, как описано в примере 8, а также процессы, описанные ниже. Производственные прогоны также включают уменьшенные модели (SDM), которые проводят по существу так же, как и производственные прогоны, но в которых используют меньшее количество Т-клеток в процессе конструирования клеток. Как правило, при уменьшении производственные прогоны включают процессы, описанные в Таблице Е3.

В анализируемых процессах, Т-клетки сконструированы либо с анти-CD19 CAR, либо с анти-BCMA CAR. Типовые анти-CD19 CAR содержат анти-CD19 scFv, полученный из антитела FMC63 мыши, иммуноглобулиновый спейсер, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую область, полученную из 4-1BB и CD3-дзета внутриклеточный сигнальный домен. Вектор также кодирует усеченную рецепторную молекулу, которая служит в качестве суррогатного маркера для CAR экспрессии, который отделен от CAR конструкции T2A последовательностью. Типовой анти-BCMA CAR содержит scFv антигенсвязывающий домен, специфический для BCMA, CD28 трансмембранную область, 4-1BB костимулирующую сигнальную область и полученный из CD3-дзета внутриклеточный сигнальный домен. Вектор также кодирует усеченную рецепторную молекулу, которая служит в качестве суррогатного маркера для CAR экспрессии, который отделен от CAR конструкции T2A последовательностью.

Процессы включают стимулирование Т-клеток либо с анти-CD3/анти-CD28 парамагнитными гранулами, либо с анти-CD3/анти-CD28 Fab конъюгированными с олигомерными реагентами мутеина стрептавидина. Олигомерный реагент содержит полимер мутеина стрептавидина, обозначенный STREP-TACTIN® M2 (гомо-тетрамер стрептавидина, содержащий последовательности аминокислот мутеина указанные в SEQ ID NO:73 (опубликованная международная заявка № WO2018/197949). Мутеин стрептавидина также описан в патенте США № 6,103,493 и Voss and Skerra (1997) Protein Eng., 1:975-982 и Argarana et al. (1986) Nucleic Acids Research, 1871-1882). Стимулирующие агенты (анти-CD3 и анти-CD28 Fab фрагменты) мультимеризуют обратимым связыванием с олигомерным реагентом мутеина стрептавидина. Анти-CD3 и анти-CD28 Fab фрагменты обратимо связываются с олигомером мутеина стрептавидина через стрептавидиновый пептид-партнер связывания, слитый с каждым фрагментом Fab. Анти-CD3 Fab фрагмент получают из CD3 связывающего моноклонального антитела, полученного гибридомой клеточной линии OKT3 (ATCC® CRL-8001™; см. также патент США № 4,361,549) и он содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи анти-CD3 антитела OKT3, описанный у Arakawa et al J. Biochem. 120, 657-662 (1996). Эти последовательности указаны в SEQ ID NOs: 93 и 94, соответственно. Анти-CD28 Fab фрагмент получают из антитела CD28.3 (депонированного как конструкция синтетического одноцепочечного Fv под номером доступа GenBank

AF451974.1; см. также Vanhove et al., BLOOD, 15 July 2003, Vol. 102, No. 2, страницы 564-570) и он содержит вариабельные домены тяжелой и легкой цепи анти-CD28 антитела CD28.3, указанные в SEQ ID NOS: 91 и 92, соответственно. Fab фрагменты индивидуально слиты на карбокси-конце их тяжелой цепи со стрептавидин пептид-связывающей последовательностью, содержащей последовательное расположение двух стрептавидин-связывающих модулей, имеющих последовательность аминокислот SAWSHPQFEK(GGGS)2GGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 79). Пептид-меченные Fab фрагменты получают рекомбинантно (см. публикации международных патентных заявок №№ WO 2013/011011 и WO 2013/124474). Связывание пептид-меченного анти-CD3 и анти-CD28 с олигомерным реагентом мутеина стрептавидина моет быть прервано или обращено добавлением D-биотина. D-биотин конкурирует с strep-tag на агентах для связывания с партнером связывания мутеина стрептавидина, тем самым разрывая связывание.

Клетки получают в разные моменты времени во время и в конце производственных прогонов и считают и оценивают на жизнеспособность и проточной цитометрией после окрашивания антителами, распознающими поверхностные маркеры, включающие CD4, CD8, CCR7, CD27 и CD45RA.

Таблица E3

День процесса	**Сущность активности**
День 1	Клетки стимулируют со стимулирующим реагентом (например, анти-CD3/анти-CD28 парамагнитными гранулами или анти-CD3/анти-CD28 Fab конъюгированными олигомерными реагентами мутеина стрептавидина)
День 2	Клетки трансдуцируют центрифужной инокуляцией с лентивирусом кодирующим CAR (например, анти-CD19 CAR или анти-BCMA CAR)
День 3	Для когорты без размножения, биотин добавляют для стимулирования клеток с анти-CD3/анти-CD28 Fab конъюгированными олигомерными реагентами мутеина стрептавидина
День 4	Клетки восстанавливаются
День 5	Для когорты без размножения, клетки активируют с анти-CD3/анти-CD28 парамагнитными гранулами, клетки дегранулируют Клетки собирают в виде когорты без размножения; клетки промывают буфером для составления и криоконсервируют
День 5	Для когорты с размножением, клетки переносят во встряхиваемый инкубатор
День 7	Для клеток в когорте с размножением, активированных с анти-CD3/анти-

	CD28 Fab конъюгированными олигомерными реагентами мутеина стрептавидина, добавляют биотин
День 9	Для когорты с размножением, клетки, активированные с анти-CD3/анти-CD28 парамагнитными гранулами, клетки дегранулируют Клетки собирают в виде когорты с размножением; клетки промывают буфером для составления и криоконсервируют

A. Процессы конструирования Т-клеток

Сравнивают композицию Т-клеток, полученную с использованием различных процессов без размножения, которые отличаются разными характеристиками, включая исходные источники клеток (криоконсервированный аферез или свежий аферез), концентрацию олигомерного стимулирующего реагента и количество клеток, используемых для стимулирования. Также получают композиции Т-клеток, в которых клетки в дальнейшем культивируют для размножения. Процессы проводят на здоровых донорах или на пациентах-донорах.

1. Процессы без размножения

Образцы лейкафереза получают от доноров-людей и промывают. CD4+ и CD8+ клетки селектируют непосредственно через селектирование на основе иммуноаффинности из образцов лейкафереза, которые не были криоконсервированы. После селектирования, отдельные CD4+ и CD8+ композиции Т-клеток криоконсервируют и затем размораживают, и затем селектированные CD4+ и CD8+ Т-клетки смешивают при отношении 1:1 жизнеспособных CD4+ Т-клеток к жизнеспособным CD8+ Т-клеткам с получением входной композиции. Примерно 600×10^6 клеток из смешанной входной клеточной композиции (примерно 300×10^6 CD4+ и 300×10^6 CD8+) стимулируют инкубированием с 0,8 мкг на 1×10^6 клеток анти-CD3/анти-CD28 Fab конъюгированными олигомерными реагентами мутеина стрептавидина, созданными как описано выше в этом примере. Стимулирование проводят в течение 18-30 часов (24 ± 6 часов) в бессывороточной среде, содержащей минимальную среду (*например*, минимальную среду CTS™ OpTmizer, Thermo Fisher), Т-клеточную добавку (*например*, 2,6% OpTmizer® T-Cell Expansion Supplement, Thermo Fisher), замену сыворотки для иммунных клеток (*например*, 2,5% CTS™ Innune Cell Serum Replacement), 2 мМ L-глутамина, дипептидную форму L-глутамина (*например*, 1,0% Glutamax™, Thermo Fisher), рекомбинантный 100 IU/мл IL-2, рекомбинантный 600 IU/мл IL-7 и рекомбинантный 100 IU/мл IL-15. После стимулирования, вплоть до 300×10^6 клеток трансдуцируют центрифужной инокуляцией с лентивирусным вектором, кодирующим либо типовой анти-BCMA CAR, либо типовой анти-CD19 CAR.

После центрифужной инокуляции, клетки промывают и ресуспендируют с плотностью вплоть до примерно $0,75\times10^6$ клеток/мл в минимальной среде (*например*, CTS™ OpTmizer минимальной среде, Thermo Fisher) с 2 мМ глутамина, но без добавления рекомбинантных цитокинов, и инкубируют при примерно 37,0°C в инкубаторе. Через

примерно 48 часов ± 6 часов после начала стимулирования (примерно через 24 часов после начала инкубирования), 1,0 мМ D-биотина добавляют и смешивают с клетками для диссоциации анти-CD3 и анти-CD28 Fab реагентов из олигомерного стрептавидинового реагента. Клетки затем инкубируют в течение еще примерно 48 часов (примерно 96 часов ± 6 часов после инициации стимулирования или до 5 дня процесса) и затем составляют с криопротектором.

В другом процессе, образцы лейкафереза получают от доноров-людей, промывают и криоконсервируют. Криоконсервированные образцы лейкафереза размораживают, и отдельные композиции CD4+ и CD8+ клеток выбирают из каждого образца селектированием на основе иммуноаффинности и затем CD4+ и CD8+ Т-клетки смешивают с целью с получением входной композиции вплоть до примерно 900×10^6 жизнеспособных CD4+ и CD8+ Т-клеток, в которых отношение жизнеспособных CD4+ Т-клеток к жизнеспособным CD8+ Т-клеткам варьируется. Смешанные входные клеточные композиции стимулируют инкубированием с 1,2 мкг на 1×10^6 клеток анти-CD3/анти-CD28 Fab конъюгированными олигомерными реагентами мутеина стрептавидина, созданными как описано выше в этом примере (где 1,2 мкг олигомерного стимулирующего реагента включает 0,9 мкг олигомерных частиц и 0,15 мкг анти-CD3 Fab и 0,15 мкг анти-CD28 Fab). Стимулирование проводят в течение 16-24 часов (20 ± 4 часов) в той же бессывороточной полной среде, описанной выше. После стимулирования, вплоть до примерно 600×10^6 клеток трансдуцируют центрифужной инокуляцией с лентивирусным вектором, кодирующим CAR, в этом случае тем же типовым анти-BCMA CAR или типовым анти-CD19 CAR, описанным выше. В этом исследовании, клетки, которые инкубируют с более высокой концентрацией олигомерных реагентов мутеина стрептавидина, демонстрируют улучшенную эффективность трансдукции (данные не показаны). После центрифужной инокуляции в этом процессе, клетки промывают и ресуспендируют с плотностью $0,75\times10^6$ клеток/мл в минимальной среде ((*например*, CTS™ OpTmizer минимальной среде, Thermo Fisher) с 2 мМ глутамина и 2,6% Т-клеточной добавки (например, 2,6% OpTmizer® добавкой, Thermofisher) без добавления рекомбинантных цитокинов, и инкубируют при примерно 37,0°C в инкубаторе. Через примерно 48 часов ± 6 часов после начала стимулирования (примерно через 24 часов после начала инкубирования), 1,0 мМ D-биотина добавляют и смешивают с клетками для диссоциации анти-CD3 и анти-CD28 Fab реагентов из олигомерного стрептавидинового реагента. Клетки затем инкубируют в течение еще примерно 48 часов (примерно 96 часов ± 6 часов после инициации стимулирования или до 5 дня процесса) и затем составляют с криопротектором.

2. Процесс с размножением

В одном процессе, анти-CD19 CAR Т-клетки конструируют способом без размножения, описанным выше.

В другом процессе, отдельные композиции CD4+ и CD8+ клеток селектируют из образцов лейкафереза человека и криозамораживают. Выбранные клеточные композиции

затем размораживают и смешивают при отношении 1:1 жизнеспособных CD4+ Т-клеток к жизнеспособным CD8+ Т-клеткам. Приблизительно 300×10^6 Т-клеток (150×10^6 CD4 и 150×10^6 CD8+ Т-клеток) смешанной композиции стимулируют в присутствии парамагнитных гранул, покрытых полистиролом, с присоединенными анти-CD3 и анти-CD28 антителами при отношении 1:1 гранул к клеткам в бессывороточной среде, содержащей рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15 в течение 18-30 часов. После инкубирования, приблизительно 100×10^6 жизнеспособных клеток из стимулированной клеточной композиции концентрируют в бессывороточной среде, содержащей рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15. Клетки трансдуцируют центрифужной инокуляцией при приблизительно 1600 g в течение 60 минут, с лентивирусным вектором, кодирующим типовой CAR, в этом случае, типовой анти-BCMA CAR, писанный выше. После центрифужной инокуляции, клетки ресуспендируют в бессывороточной среде, содержащей рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15 и инкубируют в течение примерно 18-30 часов при примерно 37°C. Затем клетки культивируют для размножения переносом в биореактор (например, биореактор с качательным движением) в примерно 500 мл типовой бессывороточной среды, содержащей двойную концентрацию IL-2, IL-7 и IL-15, как применяется во время стадий инкубирования и трансдукции. Когда достигается плотность множества жизнеспособных клеток, начинают перфузию, где среду заменяют полунепрерывной перфузией при непрерывном перемешивании. Клетки культивируют в течение следующего дня в биореакторе до достижения пороговой плотности клеток примерно 3×10^6 клеток/мл, что обычно происходит в процессе, включающем 6-7 дни размножения. Анти-CD3 и анти-CD28 антитело, конъюгированное с парамагнитными гранулами, удаляют из клеточной композиции обработкой магнитным полем. Затем клетки собирают, составляют и криоконсервируют.

B. Контрольные показатели процесса

Контрольные показатели процесса, такие как общее количество живых клеток (ФИГ. 13A) и жизнеспособность (ФИГ. 13B) отслеживают в течение производственных прогонов. Как показано на ФИГ. 13A, минимальное размножение клеток наблюдают на 5 день, а устойчивое размножение начинается после 5 дня. На ФИГ. 13B показано начальное снижение жизнеспособности клеток в производственных прогонах, которое начинает повышаться при начале размножения клеток после 5 дня процессов.

Результаты сравнения фенотипа памяти/дифференциации в разные моменты времени в производственных прогонах показаны на ФИГ. 13C (через экспрессию CD5RA и CCR7) и на ФИГ. 13D (через экспрессию CD27 и CCR7). Как показано, ранняя оценка клеток во время производственных прогонов показывает, что клетки на примерно 5 день по существу являются более обогащенными менее дифференцированными типами клеток, такими как CCR7+CD45RA- или CCR7+CD27+ клетки, по сравнению с клетками как на более раннем этапе процесса (например, в 1 день или 2 день) или более позднем этапе процесса (например, в 9 день). Количество CD57+ клеток анализируют в течение всего производственного процесса. Как показано на ФИГ. 14, количество CD8+CD57+ клеток

снижается в течение производственного процесса, в то время как количество CD4+CD57+ клеток остается низким все время.

Настоящее изобретение не предназначено для ограничения объема конкретными раскрытыми вариантами осуществления, которые представлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композицией и способов станут очевидными из описания и идей в настоящем документе. Такие вариации могут быть применены на практике, не выходя за рамки истинного объема и сущности описания, и предназначены для того, чтобы быть включенными в объем настоящего описания.

Последовательности

#	**ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ**	**АННОТАЦИЯ**
1	ESKYGPPCPPCP	спейсер (IgG4 шарнир) (aa)
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCT	спейсер (IgG4 шарнир) (nt)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Шарнир-CH3 спейсер
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Шарнир-CH2-CH3 спейсер
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGR GGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAV QDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGV EEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPS LPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCE VSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFW AWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVS YVTDH	IgD-шарнир-Fc
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINA TNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDIL KTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQF	tEGFR

	SLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINW KKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCW GPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCP AGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGL EGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 153-179 из № доступа P10747)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 114-179 из № доступа P10747)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY RS	CD28 (аминокислоты 180-220 из P10747)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY RS	CD28 (LL до GG)
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL	4-1BB (аминокислоты 214-255 из Q07011.1)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 дзета
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 дзета
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 дзета
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVA FRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTD	tEGFR

	LHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSC KATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVD KCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPD NCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGH VCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALL LLLVVALGIGLFM	
17	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGGG)5-P- где P является пролином, G является глицином и S является серином	Линкер
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	Линкер
24	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatcc ca	GMCSFR альфа цепь сигнальной последовательност и
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	GMCSFR альфа цепь сигнальной последовательност и
26	MALPVTALLLPLALLLHA	CD8 альфа сигнального пептида
27	EPKSCDKTHTCPPCP	Шарнир
28	ERKCCVECPPCP	Шарнир
29	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCPEPKSCDTPPPCPRCP	Шарнир
30	ESKYGPPCPSCP	Шарнир
31	X_1PPX_2P X1 является глицином, цистеином или аргинином X2 является цистеином или треонином	Шарнир

32	YGPPCPPCP	Шарнир
33	KYGPPCPPCP	Шарнир
34	EVVVKYGPPCPPCP	Шарнир
35	RASQDISKYLN	CDR L1
36	SRLHSGV	CDR L2
37	GNTLPYTFG	CDR L3
38	DYGVS	CDR H1
39	VIWGSETTYYNSALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3
41	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVT VSS	VH
42	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT	VL
43	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGS TKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQ VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSS	scFv
44	KASQNVGTNVA	CDR L1
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISSVVDFYFDY	CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVK QRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSS TAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWGQGT TVTVSS	VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQK	VL

	PGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQS KDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	
52	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVK QRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSS TAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDR VSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSG VPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYT SGGGTKLEIKR	scFv
54	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
55	HTSRLHS	LC-CDR2
56	QQGNTLPYT	LC-CDR3
57	gacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgac catcagctgccgggccagccaggacatcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcc cgacggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgccca gccggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaac aggaagatatcgccacctacttttgccagcagggcaacacactgccctacacctttggcgg cggaacaaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggc gagggcagcaccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggcc cccagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacgg cgtgagctggatccggcagccccccaggaagggcctggaatggctgggcgtgatctggg gcagcgagaccacctactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcatcaaggac aacagcaagagccaggtgttcctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccat ctactactgcgccaagcactactactacggcggcagctacgccatggactactggggcca gggcaccagcgtgaccgtgagcagc	Последовательность кодирующая scFv
58	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер
59	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT YTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPML	IgG2 Fc человека (Uniprot P01859)

	DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK	
60	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	IgG4 Fc человека (Uniprot P01861)
61	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKMDSS RDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISP DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE	FKBP
62	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSS RDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISP DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE	FKBP12v36
63	MGSNKSKPKDASQRRR	мотив ацилирования
64	Met-Gly-Cys-Xaa-Cys	область двойного ацилирования
65	Cys-Ala-Ala-Xaa	CAAX рамка
66	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGAL TGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTV AWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTT EANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAAKKAGVNNGNP LDAVQQ	Стрептавидин Виды: Streptomyces avidinii UniProt № P22629
67	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAES RYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSA TTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGH DTFTKVKPSAAS	Минимальный стрептавидин Виды: Streptomyces avidinii
68	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY**IGAR**GNAES RYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSA TTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGH	Мутеин Стрептавидина Ile44-Gly45-Ala-46-

	DTFTKVKPSAAS	Arg47 Виды: Streptomyces avidinii
69	WSHPQFEK	Strep-tag® II
70	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
71	WSHPQFEKGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
72	WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
73	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY**IGAR**GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин Стрептавидина Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 Виды: Streptomyces avidinii
74	-Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-	Стрептавидин-связывающий пептид Xaa является любой аминокислотой; Yaa является Gly или Glu Zaa является Gly, Lys или Arg
75	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	Стрептавидин-связывающий пептид, Strep-tag®
76	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa)n-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	Последовательные модули стрептавидин-связывающего пептида Xaa является любой аминокислотой; n

		равно 8 или 12
77	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)n-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	Последовательные модули стрептавидин-связывающего пептида; n равно 2 или 3
78	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
79	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
80	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY**VTAR**GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAAKKAGVNNGNPLDAVQQ	Мутеин Стрептавидина Val44-Thr45-Ala46-Arg47 Streptomyces avidinii
81	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY**VTAR**GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин Стрептавидина Val44-Thr45-Ala46-Arg47 Streptomyces avidinii
82	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY**VTAR**GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин Стрептавидина Val44-Thr45-Ala46-Arg47 Streptomyces avidinii
83	His-Pro-Gln-Phe	Стрептавидин-связывающий пептид
84	Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa	Стрептавидин-связывающий пептид Oaa является Trp,

		Lys или Arg; Xaa является любой аминокислотой; Yaa является Gly или Glu Zaa является Gly, Lys или Arg
85	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY**IGAR**GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAAKKAGVNNGNPLDAVQQ	Мутеин Стрептавидина Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 Виды: Streptomyces avidinii
86	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин Стрептавидина Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 и Glu117, Gly120, Try121 (мутеин m1-9) Виды: Streptomyces avidinii
87	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин Стрептавидина Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 и Glu117, Gly120, Try121 (мутеин m1-9) Виды: Streptomyces avidinii
88	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Минимальный стрептавидин Виды: Streptomyces avidinii
89	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-$(GlyGlyGlySer)_2$Gly-Gly-	Мутеин

	Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	Стрептавидина
90	Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	Strep-tag®
91	LQQSGAELVKPGASVRLSCKASGYTFTEYIIHWIKLRSGQ GLEWIGWFYPGSNDIQYNAKFKGKATLTADKSSSTVYME LTGLTSEDSAVYFCARRDDFSGYDALPYWGQGTMVTV	VH анти-CD28 антитело CD28,3
92	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRTNENIYSNLAWYQQKQ GKSPQLLIYAATHLVEGVPSRFSGSGSGTQYSLKITSLQSE DFGNYYCQHFWGTPCTFGGGTKLEIKR	VL анти-CD28 антитело CD28,3
93	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVK QRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLT VSS	VH анти-CD3 антитело OKT3
94	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKS GTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEA EDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIN	VL анти-CD3 антитело OKT3
95	AMQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTFGVHWVR QSPGKGLEWLGVIWASGITDYNVPFMSRLSITKDNSKSQV FFKLNSLQPDDTAIYYCAKNDPGTGFAYWQGTLVTVSST KGPSVFPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCGSAWSHPQFEKGGGSGGGSGGS AWSHPQFEK	Вариабельная тяжелая цепь Fab фрагмента m13B8.2
96	AMDIQMTQSPASLSASVGETVTFTCRASEMIYSYLAWYQ QKQGKSPQLLVHDAKTLAEGVPSRFSGGGSGTQFSLKINT LQPEDFGTYYCQAHYGNPPTFGGGTKLEIKRGIAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGECGS	Вариабельная легкая цепь Fab фрагмента m13B8.2
97	QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDTYIHWVQQ APGKGLEWMGRIDPANDNTLYASKFQGRVTITADTSTDT AYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGYYVFDHWGQGTLVTV SS	Вариабельная тяжелая цепь huOKT8
98	DVQITQSPSSLSASVGDRVTITCRTSRSISQYLAWYQQKPG KVPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDV	Вариабельная легкая цепь

	ATYYCQQHNENPLTFGGGTKVEIK	huOKT8

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обогащения Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где первое селектирование включает обогащение либо CD57-, либо CD3+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая обогащенную популяцию Т-клеток; и

(b) проведение второго селектирования на клетках из обогащенной популяции Т-клеток, где:

первое селектирование содержит обогащение CD57- Т-клеток и второе селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из обогащенной популяции; или

первое селектирование содержит обогащение CD3+ Т-клеток и второе селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из обогащенной Т-клеточной популяции,

где способ создает истощенную популяцию, содержащую меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец, и обогащенную CD3+ Т-клетками.

2. Способ обогащения Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию, где истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток чем биологический образец; и

(b) проведение второго селектирования на клетках из истощенной популяции, где второе селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из истощенной популяции, обогащение тем самым создает обогащенную популяцию CD57-CD3+ Т-клеток.

3. Способ обогащения Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где первое селектирование включает обогащение CD3+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая обогащенную популяцию Т-клеток; и

(b) проведение второго селектирования на клетках из обогащенной популяции Т-клеток, где второе селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из обогащенного образца популяции клеток, тем самым создавая истощенную популяцию, где истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток чем биологический образец и/или чем обогащенная популяция Т-клеток, и обогащена CD3+ Т-клетками.

4. Способ обогащения Т-клеток, где способ включает:

(a) проведение первого селектирования, где указанное первое селектирование включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего первичные Т-клетки человека, тем самым создавая первую истощенную популяцию, где указанная первая истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец;

(b) проведение второго селектирования на клетках из первой истощенной популяции, где указанное второе селектирование включает обогащение одних из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток из первой истощенной популяции, где обогащение тем

самым создает вторую истощенную популяцию, обогащенную одними из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток, и не селектированную популяцию; и

(c) проведение третьего селектирования, где указанное третье селектирование включает обогащение других из (i) CD4+ клеток и (ii) CD8+ клеток из не селектированной популяции, где обогащение тем самым создает третью истощенную популяцию, обогащенную другими из (i) CD4+ Т-клеток и (ii) CD8+ Т-клеток.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит, по меньшей мере, одно из следующих:

(i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток;

(ii) частоту CD57+ Т-клеток, которая меньше чем или примерно 35% от частоты CD57+ Т-клеток, присутствующих в биологическом образце;

(iii) CD4+ Т-клетки, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD4+ Т-клеток являются CD57-; и

(iv) CD8+ Т-клетки, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD8+ Т-клеток являются CD57-.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где биологический образец содержит продукт афереза или продукт лейкафереза.

7. Способ обогащения Т-клеток, где способ включает удаление CD57+ Т-клеток из биологического образца, содержащего продукт афереза или продукт лейкафереза, содержащий первичные Т-клетки человека, тем самым создавая истощенную популяцию Т-клеток, где истощенная популяция содержит меньше CD57+ Т-клеток, чем биологический образец, и где истощенная популяция содержит, по меньшей мере, одно из следующих:

(i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток;

(ii) частоту CD57+ Т-клеток, которая меньше чем или примерно 35% от частоты CD57+ Т-клеток, присутствующих в биологическом образце;

(iii) CD4+ Т-клетки, где по меньшей мере, точно или примерно 95% CD4+ Т-клеток являются CD57-; и

(iv) CD8+ Т-клетки, где по меньшей мере, точно или примерно 95% CD8+ Т-клеток являются CD57-.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD4+ Т-клеток истощенной популяции содержит CD57-CD4+ Т-клетки.

9. Способ по любому из пп. 1-7, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD8+ Т-клеток истощенной популяции содержит CD57-CD8+ Т-клетки.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD4+ Т-клеток и 95% CD8+ Т-клеток истощенной популяции содержит CD57-CD4+ Т-клетки и CD57-CD8+ Т-клетки, соответственно.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD3+ Т-клеток истощенной популяции содержит CD57-CD3+ Т-клетки.

12. Способ по любому из пп. 7-11, где истощенная популяция является первой истощенной популяцией, и способ дополнительно содержит селектирование для CD4+ Т-клеток из первой истощенной популяции, тем самым создавая вторую истощенную популяцию которая является обогащенной популяцией CD57-CD4+ Т-клеток, и не селектированную популяцию.

13. Способ по п. 12, где способ дополнительно содержит селектирование для CD8+ Т-клеток из не селектированной популяции, тем самым создавая третью истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD8+ Т-клеток, и вторую не селектированную популяцию.

14. Способ по любому из пп. 7-11, где истощенная популяция является первой истощенной популяцией, и способ дополнительно содержит селектирование для CD8+ Т-клеток из первой истощенной популяции, тем самым создавая вторую истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD8+ Т-клеток, и не селектированную популяцию.

15. Способ по п. 14, где способ дополнительно содержит селектирование для CD4+ Т-клеток из не селектированной популяции, тем самым создавая третью истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD4+ Т-клеток, и вторую не селектированную популяцию.

16. Способ по любому из пп. 7-11, где истощенная популяция является первой истощенной популяцией, и способ дополнительно содержит селектирование для CD3+ Т-клеток из первой истощенной популяции, тем самым создавая вторую истощенную популяцию, которая является обогащенной популяцией CD57-CD3+ Т-клеток, и не селектированную популяцию.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где частота CD57+ Т-клеток в истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) составляет менее чем примерно или примерно 35%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1% или 0,1% от частоты CD57+ Т-клеток в биологическом образце.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) содержит менее чем примерно или примерно3%, менее чем примерно или примерно 2%, менее чем примерно или примерно 1%, менее чем примерно или примерно 0,1% или менее чем примерно или примерно 0,01% CD57+ Т-клеток.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где истощенная популяция (необязательно первая истощенная популяция, вторая истощенная популяция или третья истощенная популяция) не содержит или по существу не содержит CD57+ Т-клетки.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где частота подобных наивным Т-клеток в истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) составляет, по меньшей мере, примерно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше, чем частота

подобных наивным Т-клеток в биологическом образце.

21. Способ по п. 20, где подобные наивным Т-клетки являются поверхностно положительными для одного или более из маркеров, выбранных из CD45RA, CD27, CD28 и CCR7.

22. Способ по любому из пп. 1-21, где частота CD27+ Т-клеток в истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) составляет, по меньшей мере, примерно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% более чем частота соответствующих клеток в биологическом образце.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где частота CD28+ Т-клеток в истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) составляет, по меньшей мере, примерно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% более чем частота соответствующих клеток в биологическом образце.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где частота CD27+/CD28+ Т-клеток в истощенной популяции (необязательно, первой истощенной популяции, второй истощенной популяции или третьей истощенной популяции) составляет, по меньшей мере, примерно или примерно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% больше, чем частота соответствующих клеток в биологическом образце.

25. Способ по любому из пп. 4-6, 13, 15 и 17-24, дополнительно включающий объединение второй истощенной популяции и третьей истощенной популяции, необязательно при отношении от точно или примерно 1:3 и точно или примерно 3:1, необязательно точно или примерно 1:1, тем самым создавая истощенную популяцию, содержащую вторую истощенную популяцию и третью истощенную популяцию.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где способ дает композицию Т-клеток, содержащую, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD57-CD4+ Т-клеток.

27. Способ по любому из пп. 1-25, где способ дает композицию Т-клеток, содержащую, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD57-CD8+ Т-клеток.

28. Способ по любому из пп. 1-25, где способ дает композицию Т-клеток, содержащую, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 97%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD57-CD3+ Т-клеток.

29. Способ по п. 28, где отношение CD4+ и CD8+ Т-клеток в композиции составляет от 3:1 до 1:3, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5 или от 1,2:1 до 1:1,2, все включительно.

30. Способ по п. 28 или п. 29, где отношение CD4+ к CD8+ Т-клеткам в

композиции составляет или примерно 1:1.

31. Способ по любому из пп. 1-30, где первичные Т-клетки получены от субъекта-человека.

32. Способ по любому из пп. 1-31, где первичные Т-клетки получены от субъекта с заболеванием или состоянием.

33. Способ по п. 32, где заболеванием или состоянием является рак.

34. Способ по любому из пп. 1-30, где первичные Т-клетки получены от здорового субъекта.

35. Способ по любому из пп. 1-34, где биологический образец содержит CD4+ и CD8+ клетки.

36. Способ по любому из пп. 1-35, где удаление CD57+ Т-клеток включает селектирование на основе иммуноаффинности.

37. Способ по п. 36, где селектирование на основе иммуноаффинности включает контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD57, и восстановление клеток, не связанных с антителом, тем самым проводя отрицательное селектирование, где восстановленные клетки истощают CD57+ клетки.

38. Способ по любому из пп. 1-37, где обогащение клеток, необязательно в первом, втором и/или третьем селектировании, содержит селектирование на основе иммуноаффинности.

39. Способ по п. 38, где первое, второе и/или третье селектирование обогащает для CD4 или CD8 Т-клеток, и селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD4 или CD8, соответственно, и восстановление клеток, связанных с антителом, тем самым осуществляя положительное селектирование, где восстановленные клетки обогащены CD4+ клетками или CD8+ клетками.

40. Способ по п. 39, где селектирование обогащает для CD3 Т-клеток, и селектирование на основе иммуноаффинности проводят через контакт клеток с антителом, способным специфически связываться с CD3, и восстановление клеток, связанных с антителом, тем самым осуществляя положительное селектирование, где восстановленные клетки обогащены CD3+ клетками.

41. Способ по любому из пп. 37-40, где антитело иммобилизовано на твердой поверхности, необязательно, где твердой поверхностью является магнитная частица.

42. Способ по любому из пп. 37-40, где антитело иммобилизовано на или присоединено к матрице для аффинной хроматографии.

43. Способ по п. 42, где антитело дополнительно содержит один или более партнеров связывания, способных образовывать обратимую связь со связывающим реагентом, иммобилизованным на матрице, где антитело обратимо связано с указанной матрицей для хроматографии во время такого контакта.

44. Способ по п. 43, где связывающим реагентом является мутеин стрептавидина, который обратимо связан с партнером связывания.

45. Способ по п. 44, где:

мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность Ile^{44}-Gly^{45}-Ala^{46}-Arg^{47} в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47 со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO:66; или

мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность Val^{44}-Thr^{45}-Ala^{46}-Arg^{47} в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47 со ссылкой на положения в стрептавидине в последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 66.

46. Способ по любому из пп. 43-45, где партнером связывания является стрептавидин-связывающий пептид.

47. Способ по п. 46, где стрептавидин-связывающий пептид выбран из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 69), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-$(GlyGlyGlySer)_3$-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:78), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:79), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-$(GlyGlyGlySer)_3$-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 70), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-$(GlyGlyGlySer)_2$-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 71) 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: 72).

48. Способ по п. 46 или п. 47, где стрептавидин-связывающий пептид имеет последовательность SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:79).

49. Способ по любому из пп. 43-48, дополнительно включающий, после контакта клеток в образце с матрицей для аффинной хроматографии, применение конкурирующего реагента для разрыва связи между партнером связывания и связывающим реагентом, тем самым восстанавливая клетки, связанные с антитело.

50. Способ по п. 49, где конкурирующим реагентом является биотин или аналог биотина.

51. Способ по любому из пп. 42-50, где матрица для хроматографии упакована в сепаратор, который является колонкой.

52. Способ по любому из пп. 1-51, где биологический образец, содержащий первичные Т-клетки, является образцом, составленным с криопротектором.

53. Способ по любому из пп. 6-52, где образец афереза или лейкафереза является образцом, составленным с криопротектором.

54. Способ стимулирования Т-клеток, где способ включает инкубирование Т-клеток входной композиции в условиях стимулирования, тем самым создавая стимулированную популяцию Т-клеток, где входная композиция получена способом по любому из пп. 1-53.

55. Способ по п. 54, где входная композиция содержит, по меньшей мере, одно из следующих:

(i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток;

(ii) по меньшей мере, точно или примерно 95% CD57- Т-клеток;

(iii) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD4+ Т-клеток;

(iv) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD8+ Т-клеток; и

(v) по меньшей мере, примерно или примерно 90% CD57-CD3+ Т-клеток.

56. Способ стимулирования Т-клеток, содержащих инкубирование Т-клеток входной композиции в условиях стимулирования, тем самым создавая стимулированную популяцию Т-клеток, где входная композиция содержит, по меньшей мере, одно из следующих:

(i) менее чем или примерно 5% CD57+ Т-клеток

(ii) по меньшей мере, точно или примерно 95% CD57- Т-клеток;

(iii) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD4+ Т-клеток;

(iv) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD8+ Т-клеток; и

(v) по меньшей мере, точно или примерно 90% CD57-CD3+ Т-клеток.

57. Способ по п. 56, где условия стимулирования включают присутствие стимулирующего реагента, где указанный стимулирующий реагент способен активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул.

58. Способ по любому из п. 57, где стимулирующий реагент содержит (i) первичный агент, который специфически связывается с членом TCR комплекса, необязательно, который специфически связывается с CD3, и (ii) вторичный агент, который специфически связывается с Т-клеточной костимулирующей молекулой, необязательно, где костимулирующую молекулу выбирают из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

59. Способ по п. 58, где, по меньшей мере, один из первичных и вторичных агентов содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

60. Способ по п. 58 или п. 59, где первичным агентом является анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и вторичным агентом является анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

61. Способ по п. 59 или п. 60, где антигенсвязывающим фрагментом является одновалентный фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fab фрагмента, Fv фрагмента и одноцепочечного Fv фрагмента (scFv).

62. Способ по любому из пп. 58-61, где первичным агентом является анти-CD3 Fab, и вторичный агент содержит анти-CD28 Fab.

63. Способ по любому из пп. 58-62, где каждый из первичного агента и вторичного агента присутствует или присоединен на поверхности твердой подложки.

64. Способ по п. 63, где твердая подложка является или содержит гранулу, необязательно, парамагнитный шарик.

65. Способ по п. 64, где твердой подложкой является парамагнитный шарик с присоединенными на поверхности анти-CD3 и анти-CD28 антителами, и стимулирующий реагент присутствует при отношении менее чем примерно или примерно 3:1 гранул к

клеткам.

66. Способ по п. 65, где стимулирующий реагент присутствует при отношении, равном или равном примерно 1:1 гранул к клеткам.

67. Способ по любому из пп. 58-62, где первичный агент и вторичный агент обратимо связаны на поверхности реагента из олигомерных частиц, содержащих множество молекул стрептавидина или молекул мутеина стрептавидина.

68. Способ по п. 67, где молекулы стрептавидина или молекулы мутеина стрептавидина связаны или способны связываться с биотином, авидином, аналогом биотина или мутеином биотин, аналогом авидина или мутеином авидина и/или его биологически активным фрагментом.

69. Способ по п. 67 или п. 68, где молекулы мутеина стрептавидина содержат аминокислотную последовательность Val^{44}-Thr^{45}-Ala^{46}-Arg^{47} или Ile^{44}-Gly^{45}-Ala^{46}-Arg^{47} на аминокислотных остатках, соответствующих остаткам 44-47, со ссылкой на последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 66.

70. Способ по любому из пп. 67-69, где молекулы мутеина стрептавидина содержат:

a) последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NOS: 70-73, 78, 85-89;

b) последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, примерно или примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к любой из SEQ ID NOS: 70-73, 78, 85-89 и содержит аминокислотную последовательность, соответствующую Val^{44}-Thr^{45}-Ala^{46}-Arg^{47} или Ile^{44}-Gly^{45}-Ala^{46}-Arg^{47} и/или обратимо связывается с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом; или

c) функциональный фрагмент a) или b), который обратимо связывается с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом.

71. Способ по любому из пп. 67-70, где молекулы мутеина стрептавидина содержат последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:73.

72. Способ по любому из пп. 67-70, где молекулы мутеина стрептавидина содержат последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 78.

73. Способ по любому из пп. 67-72, где каждый из первичного агента и вторичного агента содержит стрептавидин-связывающий пептид.

74. Способ по п. 73, где стрептавидин-связывающий пептид выбран из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 69), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-$(GlyGlyGlySer)_3$-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 70), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-$(GlyGlyGlySer)_2$-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 71) 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: 89).

75. Способ по любому из пп. 67-74, где первичный агент содержит анти-CD3 Fab, и

где вторичный агент содержит анти-CD28 Fab.

76. Способ по любому из пп. 67-75, где реагент из олигомерных частиц имеет радиус более чем примерно или примерно 60 нм, более чем примерно или примерно 70 нм, более чем примерно или примерно 80 нм или более чем примерно или примерно 90 нм.

77. Способ по любому из пп. 67-76, где реагент из олигомерных частиц имеет молекулярную массу: по меньшей мере, примерно или примерно 5×10^7 г/моль или, по меньшей мере, примерно или примерно 1×10^8 г/моль; или от 5×10^7 г/моль до 5×10^8 г/моль, от 1×10^8 г/моль до 5×10^8 г/моль или от 1×10^8 г/моль до 2×10^8 г/моль, все включительно.

78. Способ по любому из пп. 67-77, где реагент из олигомерных частиц содержит, по меньшей мере, примерно или примерно 500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере, примерно или примерно 1000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере, примерно или примерно 1500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина или, по меньшей мере, примерно или примерно 2000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина; или; от 1000 до 20000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, от 1000 до 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина или от 2000 до 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина.

79. Способ по любому из пп. 61-78, дополнительно включающий отделение стимулирующего реагента от клеток, где указанное отделение включает контакт клеток с веществом, где указанное вещество способно образовывать обратимые связи между первичными и вторичными агентами и реагентом из олигомерных частиц.

80. Способ по п. 79, где веществом является свободным партнером связывания и/или является конкурирующим агентом.

81. Способ по п. 79 или п. 80, где вещество является или содержит стрептавидин-связывающий пептид, биотин или его биологические активный фрагмент или аналог биотина или его биологические активный фрагмент.

82. Способ по п. 81, где вещество является или содержит биотин или аналог биотина.

83. Способ по любому из пп. 56-82, где условия стимулирования включают присутствие одного или более рекомбинантных цитокинов.

84. Способ по любому из пп. 56-83, где условия стимулирования включают присутствие одного или более из рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15.

85. Способ генетически сконструированных Т-клеток, где способ включает введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в популяцию Т-клеток из композиции Т-клеток, полученной способом по любому из пп. 1-53, тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток.

86. Способ генетического конструирования Т-клеток, где способ включает введение гетерологичного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор в популяцию Т-клеток из стимулированной Т-клеточной популяция по любому из пп. 54-84,

тем самым создавая сконструированную популяцию Т-клеток.

87. Способ по п. 85 или п. 86, где введение включает трансдукцию вирусным вектором, содержащим гетерологичный полинуклеотид.

88. Способ по п. 87, где вирусным вектором является гаммаретровирусный вектор или лентивирусный вектор.

89. Способ по п. 87 или п. 88, где вирусным вектором является лентивирусный вектор.

90. Способ по любому из пп. 85-89, дополнительно включающий инкубирование композиции, содержащей трансдуцированные клетки в течение вплоть до 96 часов после введения, необязательно при температуре точно или примерно 37° ± 2°C.

91. Способ по п. 90, где инкубирование проводят в течение вплоть до 72 часов после введения.

92. Способ по п. 90, где инкубирование проводят в течение вплоть до 48 часов после введения.

93. Способ по п. 90, где инкубирование проводят в течение вплоть до 24 часов после введения.

94. Способ по любому из пп. 90-93, где инкубирование дает интеграцию вирусного вектора в геном Т-клетки.

95. Способ по любому из пп. 85-94, дополнительно включающий культивирование клеток сконструированной популяции в условиях способствующих пролиферации или размножению сконструированных клеток, тем самым создавая размноженную популяцию клеток.

96. Способ по п. 95, где культивирование проводят в присутствии одного или более рекомбинантных цитокинов, необязательно содержащих один или более IL-2, IL-7 и IL-15.

97. Способ по п. 95 или п. 96, где пролиферация или размножение дает примерно или, по меньшей мере, точно или примерно 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное или больше чем или примерно 5-кратное повышение количества жизнеспособных Т-клеток, содержащих гетерологичный полинуклеотид, по сравнению с началом культивирования.

98. Способ по любому из пп. 1-97, дополнительно включающий сбор или получение популяции клеток, полученной способом.

99. Способ по п. 98, где сбор или получение дополнительно включают составление клеток для криоконсервации в присутствии криопротектора.

100. Способ по п. 98 или п. 99, где собранные или полученные клетки составлены в присутствии фармацевтически приемлемого эксципиента.

101. Способ по любому из пп. 85-100, где рекомбинантный рецептор способен связываться с антигеном-мишенью, который ассоциирован с, является специфическим к и/или экспрессирован на клетке или ткани заболевания, расстройства или состояния.

102. Способ по п. 101, где заболеванием, расстройством или состоянием является инфекционное заболевание или расстройство, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или опухоль или рак.

103. Способ по п. 101 или п. 102, где антигеном-мишенью является опухолевый антиген.

104. Способ по любому из пп. 101-103, где антиген-мишень выбирают из αvβ6 интегрина (avb6 интегрина), антигена созревания В-клетки (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), антигена рака яичек, антигена рака/яичек 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, C-C мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, протеогликана сульфата хондроитина 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста III типа (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфринB2, эфринового рецептора A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, Fc рецептора подобного 5 (FCRL5; также известного как Fc рецептор гомолог 5 или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатного связывающего белка (FBP), фолатного рецептора альфа, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), erbB димеров, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита B, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), IL-22 рецептора альфа(IL-22Rα), IL-13 рецептора альфа 2 (IL-13Rα2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, L1 молекулы клеточной адгезии (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, члена семейства A содержащего богатые лейцином повторы 8 (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), c-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, члена D группы 2 натуральных киллеров (NKG2D) лигандов, мелана A (MART-1), нервной молекулы клеточной адгезии (NCAM), онкоэмбрионального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), прогестеронового рецептора, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, трофобласта гликопротеина (TPBG также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), тирозиназа-зависимого белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), тирозиназа-зависимого белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR), рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфического или патоген-экспрессированного антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой и/или биотинилированных молекул и/или молекул, экспрессированных HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

105. Способ по любому из пп. 101-103, где рекомбинантный рецептор является или содержит функциональный не-TCR антигенный рецептор или TCR или его антигенсвязывающий фрагмент.

106. Способ по любому из пп. 101-104, где рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

107. Способ по любому из пп. 101-106, где рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, спейсер и/или шарнирную область, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующую сигнальную область.

108. Способ по п. 107, где внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий домен, содержащий scFv.

109. Способ по п. 107 или п. 108, где внутриклеточный сигнальный домен является или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен вызывать первичный сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

110. Способ по любому из пп.107-109, где внутриклеточный сигнальный домен является или содержит внутриклеточный сигнальный домен CD3 цепи, необязательно, CD3-дзета (CD3ζ) цепи или его сигнальную часть.

111. Способ по любому из пп. 107-110, где костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или его сигнальную часть.

112. Композиция клеток, полученная способом по любому из пп. 1-53.

113. Композиция по пункту 112, где клетки содержат CD57-CD4+ Т-клетки.

114. Композиция по пункту 112, где клетки содержат CD57-CD8+ Т-клетки.

115. Композиция по пункту 112, где клетки содержат CD57-CD3+ Т-клетки.

116. Композиция, содержащая сконструированную популяцию Т-клеток, полученную способом по любому из пп. 85-111.

117. Терапевтическая композиция Т-клеток, содержащая CD4+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где, по меньшей мере, 80% всех рецептор$^+$/CD8$^+$ клеток в композиции являются CD57- и, по меньшей мере, 80% всех рецептор$^+$/CD4$^+$ клеток в композиции являются CD57-.

118. Терапевтическая композиция Т-клеток по п. 117, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 99%, примерно 100% или 100% клеток в композиции являются CD4+ Т-клетками и CD8+ Т-клетками.

119. Терапевтическая композиция Т-клеток, содержащая CD3+ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где, по меньшей мере, 80% всех рецептор$^+$/CD3$^+$ клеток в композиции являются CD57-.

120. Терапевтическая композиция Т-клеток по п. 119, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 99%, примерно 100% или 100% клеток в композиции являются CD3+ Т-клетками.

121. Терапевтическая композиция Т-клеток по любому из пп. 117-120, где отношение рецептор+/CD4+ Т-клеток к рецептор+/CD8+ Т-клеткам в композиции составляет от примерно 1:3 до примерно 3:1.

122. Терапевтическая композиция Т-клеток по любому из пп. 117-121, где отношение рецептор+/CD4+ Т-клеток к рецептор+/CD8+ Т-клеткам в композиции составляет точно или примерно 1:1.

123. Терапевтическая композиция по любому из пп. 117-122, где рекомбинантный белок является или содержит рекомбинантный рецептор, который способен связываться с белком-мишенью, который ассоциирован с, является специфическим к и/или экспрессирован на клетке или ткани заболевания, расстройства или состояния.

124. Терапевтическая композиция по любому из пп. 117-123, где рекомбинантным белком является химерный антигенный рецептор (CAR).

125. Терапевтическая композиция по любому из пп. 117-124, где количество жизнеспособных Т-клеток в композиции составляет от точно или примерно 10×10^6 клеток до точно или примерно 200×10^6 клеток, необязательно, где количество жизнеспособных Т-клеток в композиции составляет от точно или примерно 10×10^6 клеток до точно или примерно 100×10^6 клеток, точно или примерно 10×10^6 клеток и точно или примерно 70×10^6 клеток, точно или примерно 10×10^6 клеток и точно или примерно 50×10^6 клеток, точно или примерно 50×10^6 клеток и точно или примерно 200×10^6 клеток, точно или примерно 50×10^6 клеток и точно или примерно 100×10^6 клеток, точно или примерно 50×10^6 клеток и точно или примерно 70×10^6 клеток, точно или примерно 70×10^6 клеток и точно или примерно 200×10^6 клеток, точно или примерно 70×10^6 клеток и точно или примерно 100×10^6 клеток или точно или примерно 100×10^6 клеток и точно или примерно 200×10^6 клеток, все включительно.

126. Терапевтическая композиция по любому из пп. 117-125, где объем композиции составляет от 1,0 мл до 10 мл, включительно, необязательно, точно или примерно 2 мл, точно или примерно 3 мл, точно или примерно 4 мл, точно или примерно 5 мл, точно или примерно 6 мл, точно или примерно 7 мл, точно или примерно 8 мл, точно или примерно 9 мл или точно или примерно 10 мл или любое значение между любыми из вышеперечисленных.

127. Способ лечения субъекта, имеющего или предположительно имеющего заболевание, расстройство или состояние, где способ включает введение субъекту дозы Т-клеток из сконструированной популяции Т-клеток, полученной способом по любому из пп. 85-111.

128. Способ лечения субъекта, имеющего или предположительно имеющего заболевание, расстройство или состояние, где способ включает введение субъекту дозы Т-клеток из композиции по любому из пп. 112-126.

129. Способ по п. 127 или п. 128, где рекомбинантный рецептор, необязательно CAR, специфически распознает или специфически связывается с антигеном, ассоциированным с или экспрессированным или присутствующим на клетках заболевания или состояния.

130. Способ по любому из пп. 127-129, где доза Т-клеток содержит от точно или примерно 5×10^6 до точно или примерно $1{,}5\times10^8$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 5×10^6 до точно или примерно 1×10^8 экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 5×10^6 до точно или примерно 50×10^6 экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 5×10^6 до точно или примерно 25×10^6 экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 5×10^6 до точно или примерно 10×10^6 экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 10×10^6 и точно или примерно $1{,}5\times10^8$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 10×10^6 и точно или примерно 1×10^8 экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 10×10^6 и точно или примерно 50×10^6 экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 10×10^6 и точно или примерно 25×10^6 экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 25×10^6 и точно или примерно $1{,}5\times10^8$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 25×10^6 и точно или примерно 1×10^8 экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 25×10^6 и точно или примерно 50×10^6 экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 50×10^6 до точно или примерно $1{,}5\times10^8$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 50×10^6 до точно или примерно 1×10^8 экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, от точно или примерно 1×10^8 до точно или примерно $1{,}5\times10^8$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клетки, все включительно.

131. Способ по любому из пп. 127-130, где Т-клетки дозы Т-клеток являются общими Т-клетками, общими жизнеспособными Т-клетками, общими жизнеспособными Т-клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, общими жизнеспособными CD4+ Т-клетками, экспресисрующими рекомбинантный рецептор, или общими жизнеспособными CD8+ Т-клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор.

132. Способ по любому из пп. 127-131, где доза Т-клеток является аллогенной субъекту, подлежащему лечению.

133. Способ по любому из пп. 127-131, где доза Т-клеток является аутологичной субъекту, подлежащему лечению.

134. Способ по любому из пп. 127-133, где заболеванием или состоянием является рак.

135. Применение популяции сконструированных Т-клеток, полученных способом по любому из пп. 85-111, или композиции по любому из пп. 112-126 для лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

136. Применение популяции сконструированных Т-клеток, полученной способом по любому из пп. 85-111, для производства лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

137. Композиция по любому из пп. 112-126 для применения для лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

138. Применение или композиция для применения по любому из пп. 135-137, где рекомбинантный рецептор, необязательно CAR, специфически распознает или специфически связывается с антигеном, ассоциированным с или экспрессированном или присутствующим на клетке заболевания или состояния.

139. Применение или композиция для применения по любому из пп. 135-138, где заболеванием или состоянием является рак.

140. Применение или композиция для применения по любому из пп. 135-139, которая является аутологичной для субъекта.

141. Применение или композиция для применения по любому из пп. 135-140, которая является аллогенной для субъекта.

142. Изделие производства, содержащее:

(i) один или более реагентов для селектирования на основе иммуноаффинности клеток, специфических для CD57 и одного или более из CD3, CD4 и/или CD8; и

(ii) инструкции по применению одного или более реагентов для проведения способов по любому из пп. 1-141.

143. Изделие производства, содержащее:

(i) один или более реагентов для селектирования на основе иммуноаффинности клеток, специфических для CD57 и одного или более из CD3, CD4 и/или CD8;

(ii) один или более стимулирующих реагентов, способных активировать один или более внутриклеточных сигнальных доменов одного или более компонентов TCR комплекса и один или более внутриклеточных сигнальных доменов одной или более костимулирующих молекул; и

(iii) инструкции по применению одного или более реагентов для проведения способов по любому из вариантов осуществления 1-141.

144. Изделие производства по п. 142 или п. 143, где реагентом для селектирования на основе иммуноаффинности является или содержит антитело, способное специфически связываться с CD57, CD3, CD4 или CD8.

145. Изделие производства по любому из пп. 142-144, где реагентом для

селектирования на основе иммуноаффинности является или содержит антитело, способное специфически связываться с CD57.

146. Изделие производства по п. 145, где антитело иммобилизовано на магнитной частице.

147. Изделие производства по п. 145, где антитело иммобилизовано на или присоединено к матрице для аффинной хроматографии.

148. Изделие производства по любому из пп. 143-147, где стимулирующий реагент содержит (i) первичный агент, который специфически связывается с членом TCR комплекса, необязательно, который специфически связывается с CD3, и (ii) вторичный агент, который специфически связывается с костимулирующей молекулой Т-клетки, необязательно, где костимулирующую молекулу выбирают из CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 или ICOS.

149. Изделие производства по п. 148, где один или оба первичных и вторичных агентов содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

150. Изделие производства по п. 148 или п. 149, где первичные и вторичные агенты содержат антитело, необязательно, где стимулирующий реагент содержит инкубирование с анти-CD3 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, и анти-CD28 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

151. Изделие производства по любому из пп. 148-150, где первичный агент и вторичный агент присутствуют или присоединены на поверхности твердой подложки.

152. Изделие производства по п. 151, где твердая подложка является или содержит гранулу, необязательно, парамагнитную гранулу.

153. Изделие производства по любому из пп. 148-152, где первичный агент и вторичный агент обратимо связаны на поверхности реагента из олигомерных частиц, содержащих множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина.

154. Изделие производства, содержащее:

(i) композицию по любому из пп. 112-126; и

(ii) инструкции по введению композиции субъекту.

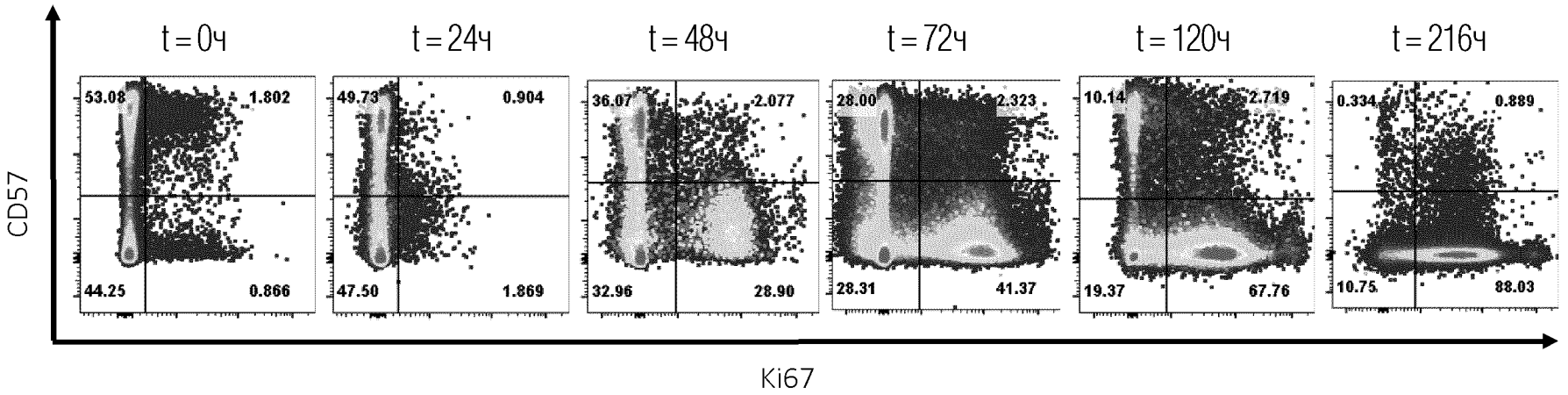
ФИГ. 1A

ФИГ. 1B

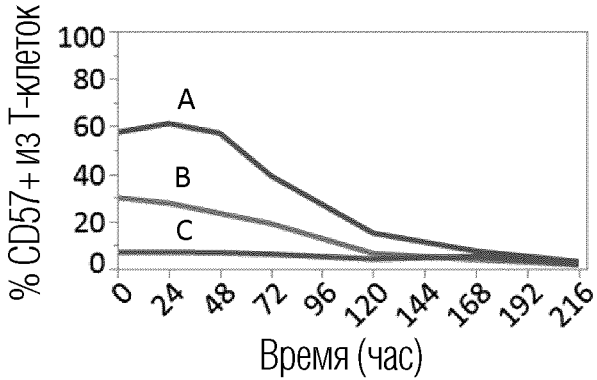
ФИГ. 1C

ФИГ. 1D

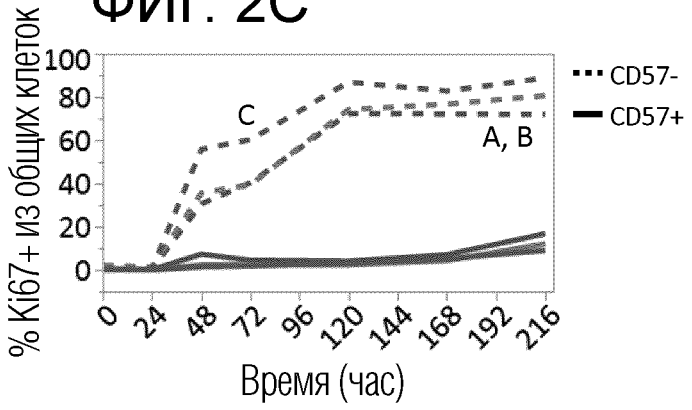
ФИГ. 2A



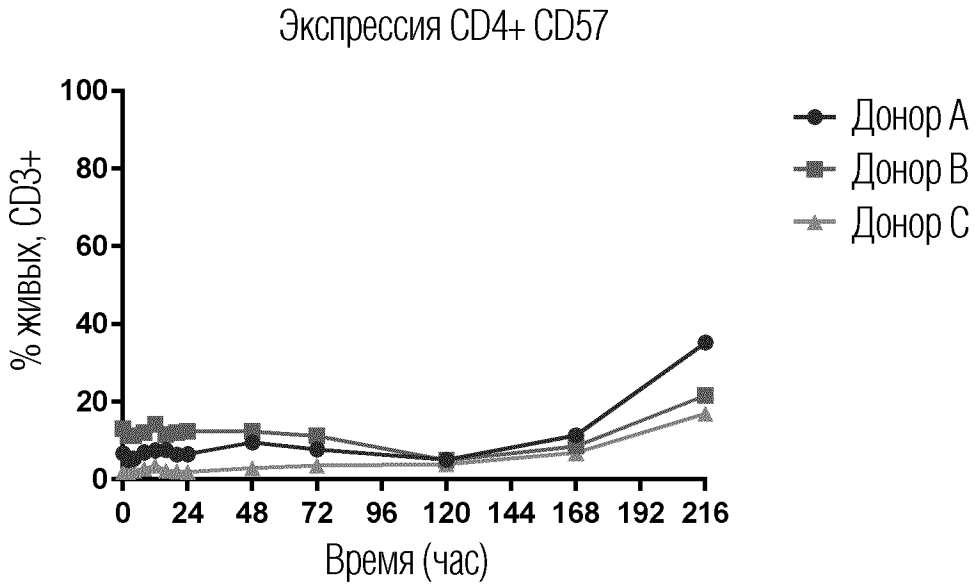
ФИГ. 2B



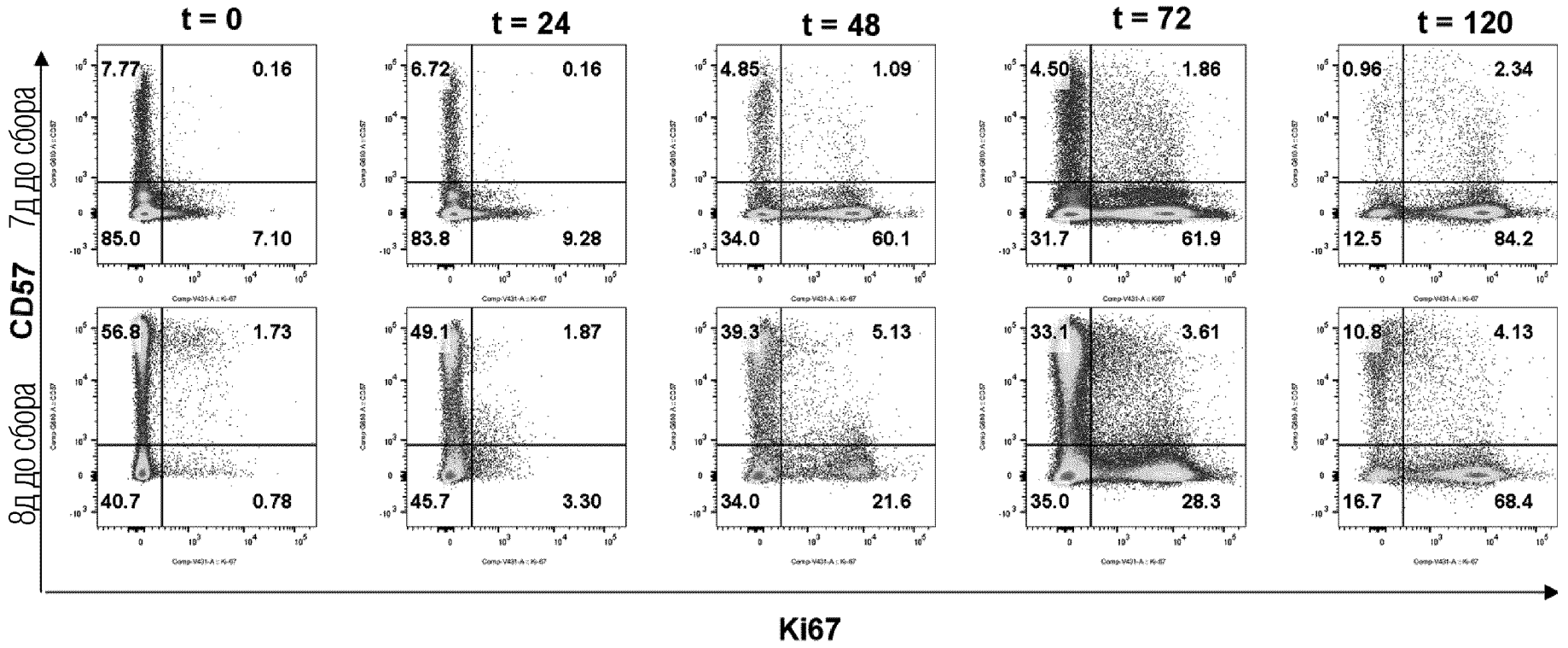
ФИГ. 2C



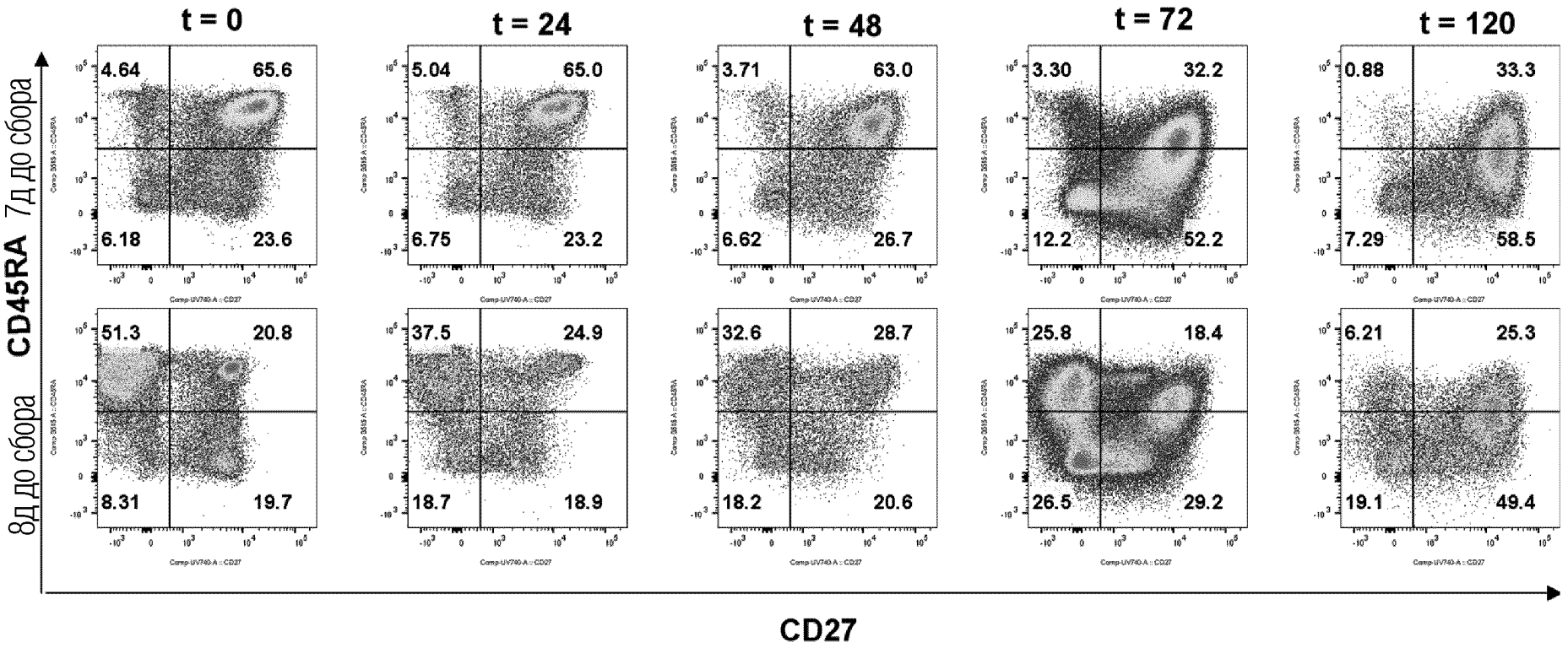
ФИГ. 2D


Экспрессия CD4+ CD57
% живых, CD3+
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
120
144
168
192
216
Время (час)
Донор A
Донор B
Донор C

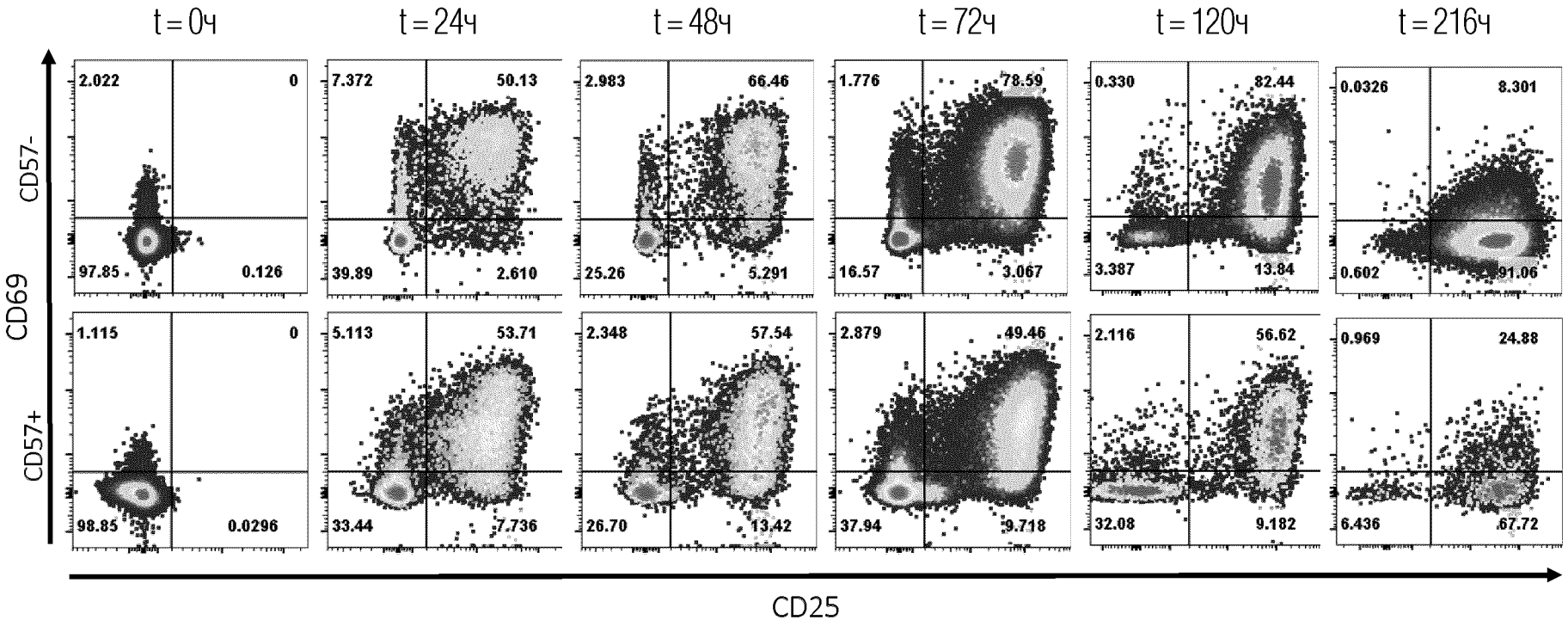
ФИГ. 2E


t = 0
t = 24
t = 48
t = 72
t = 120
7д до сбора
8д до сбора
CD57
Ki67
7.77
0.16
85.0
7.10
6.72
0.16
83.8
9.28
4.85
1.09
34.0
60.1
4.50
1.86
31.7
61.9
0.96
2.34
12.5
84.2
56.8
1.73
40.7
0.78
49.1
1.87
45.7
3.30
39.3
5.13
34.0
21.6
33.1
3.61
35.0
28.3
10.8
4.13
16.7
68.4

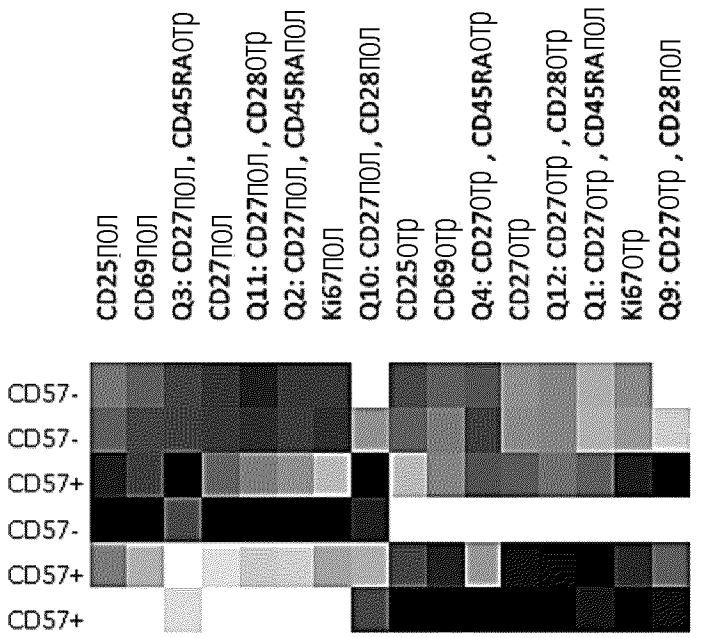
ФИГ. 2F


t = 0
t = 24
t = 48
t = 72
t = 120
4.64
65.6
6.18
23.6
5.04
65.0
6.75
23.2
3.71
63.0
6.62
26.7
3.30
32.2
12.2
52.2
0.88
33.3
7.29
58.5
51.3
20.8
8.31
19.7
37.5
24.9
18.7
18.9
32.6
28.7
18.2
20.6
25.8
18.4
26.5
29.2
6.21
25.3
19.1
49.4
CD45RA
7д до сбора
8д до сбора
CD27

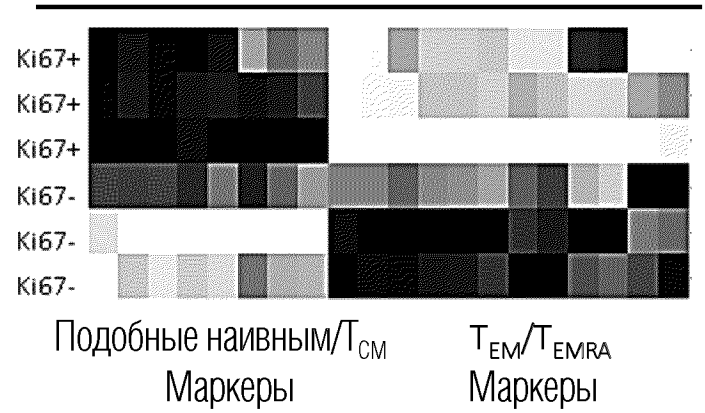
ФИГ. 3А


t = 0ч
t = 24ч
t = 48ч
t = 72ч
t = 120ч
t = 216ч
CD57-
CD57+
CD69
CD25
2.022
0
97.85
0.126
7.372
50.13
39.89
2.610
2.983
66.46
25.26
5.291
1.776
78.59
16.57
3.067
0.330
82.44
3.387
13.84
0.0326
8.301
0.602
91.06
1.115
0
98.85
0.0296
5.113
53.71
33.44
7.736
2.348
57.54
26.70
13.42
2.879
49.46
37.94
9.718
2.116
56.62
32.08
9.182
0.969
24.88
6.436
67.72

ФИГ. 3B

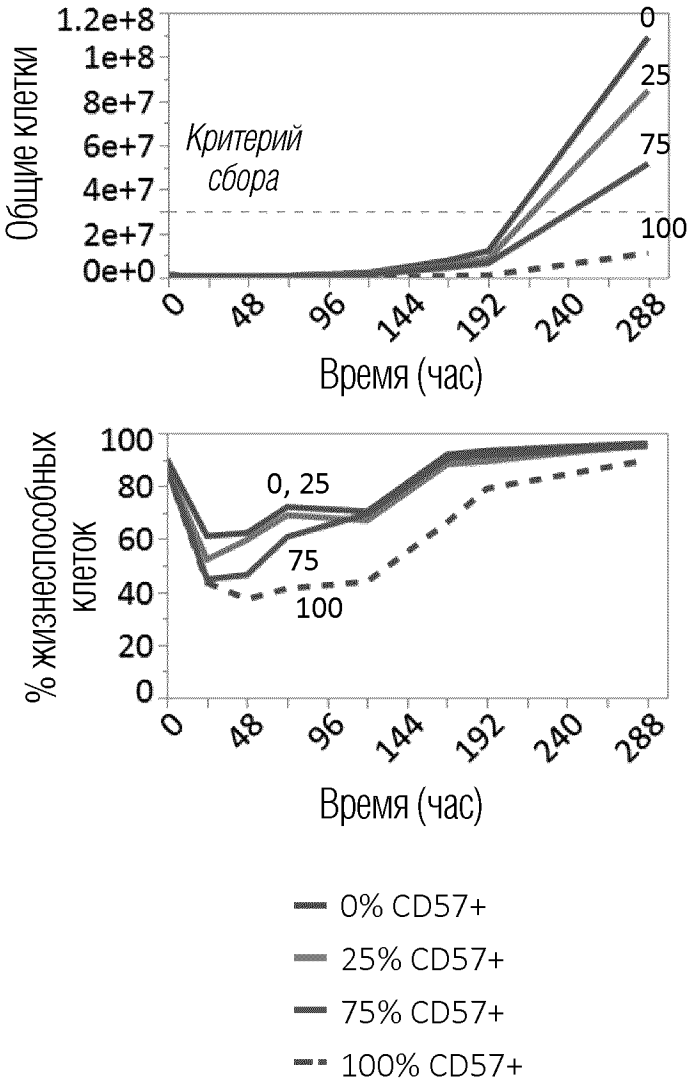

CD25пол
CD69пол
Q3: CD27пол, CD45RAотр
CD27пол
Q11: CD27пол, CD28отр
Q2: CD27пол, CD45RAпол
Ki67пол
Q10: CD27пол, CD28пол
CD25отр
CD69отр
Q4: CD27отр, CD45RAотр
CD27отр
Q12: CD27отр, CD28отр
Q1: CD27отр, CD45RAпол
Ki67отр
Q9: CD27отр, CD28пол
CD57-
CD57-
CD57+
CD57-
CD57+
CD57+

ФИГ. 3C

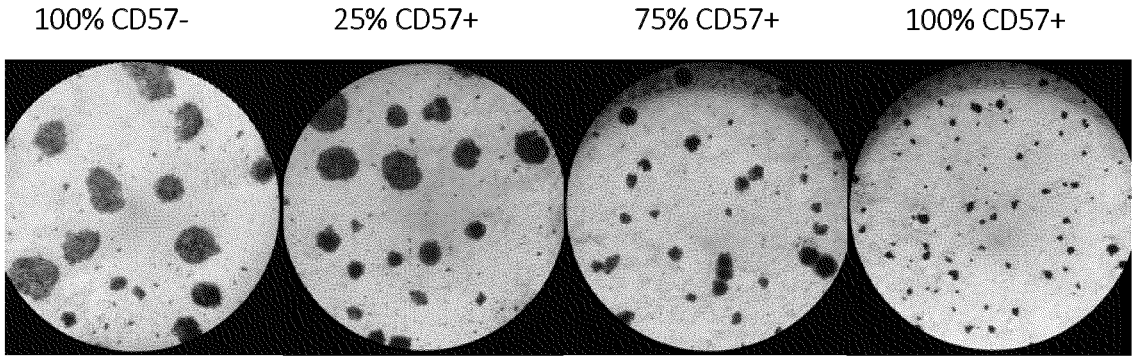

Ki67+
Ki67+
Ki67+
Ki67-
Ki67-
Ki67-
Подобные наивным/T_{CM}
Маркеры
T_{EM}/T_{EMRA}
Маркеры

Масштабирование
Низкий%
Высокий%

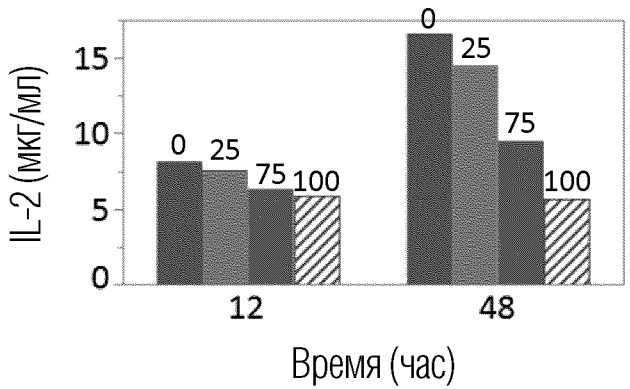
ФИГ. 4А


Общие клетки
1.2e+8
1e+8
8e+7
6e+7
4e+7
2e+7
0e+0
Критерий сбора
0
25
75
100
0
48
96
144
192
240
288
Время (час)
% жизнеспособных клеток
100
80
60
40
20
0
0, 25
75
100
0
48
96
144
192
240
288
Время (час)
0% CD57+
25% CD57+
75% CD57+
100% CD57+

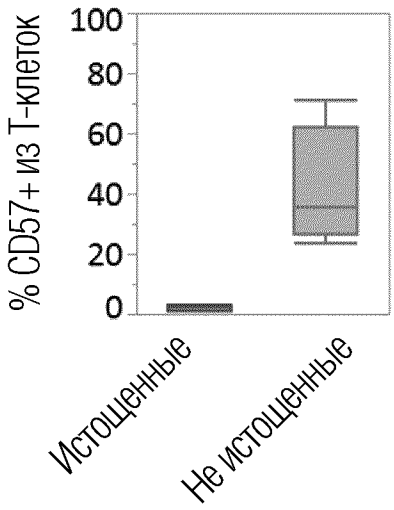
ФИГ. 4B


100% CD57-
25% CD57+
75% CD57+
100% CD57+

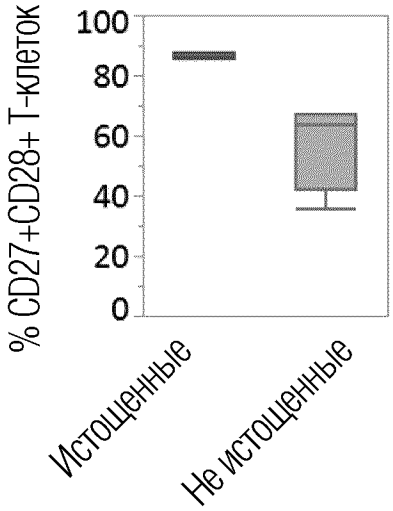
ФИГ. 4C


IL-2 (мкг/мл)
15
10
5
0
0
25
75
100
0
25
75
100
12
48
Время (час)

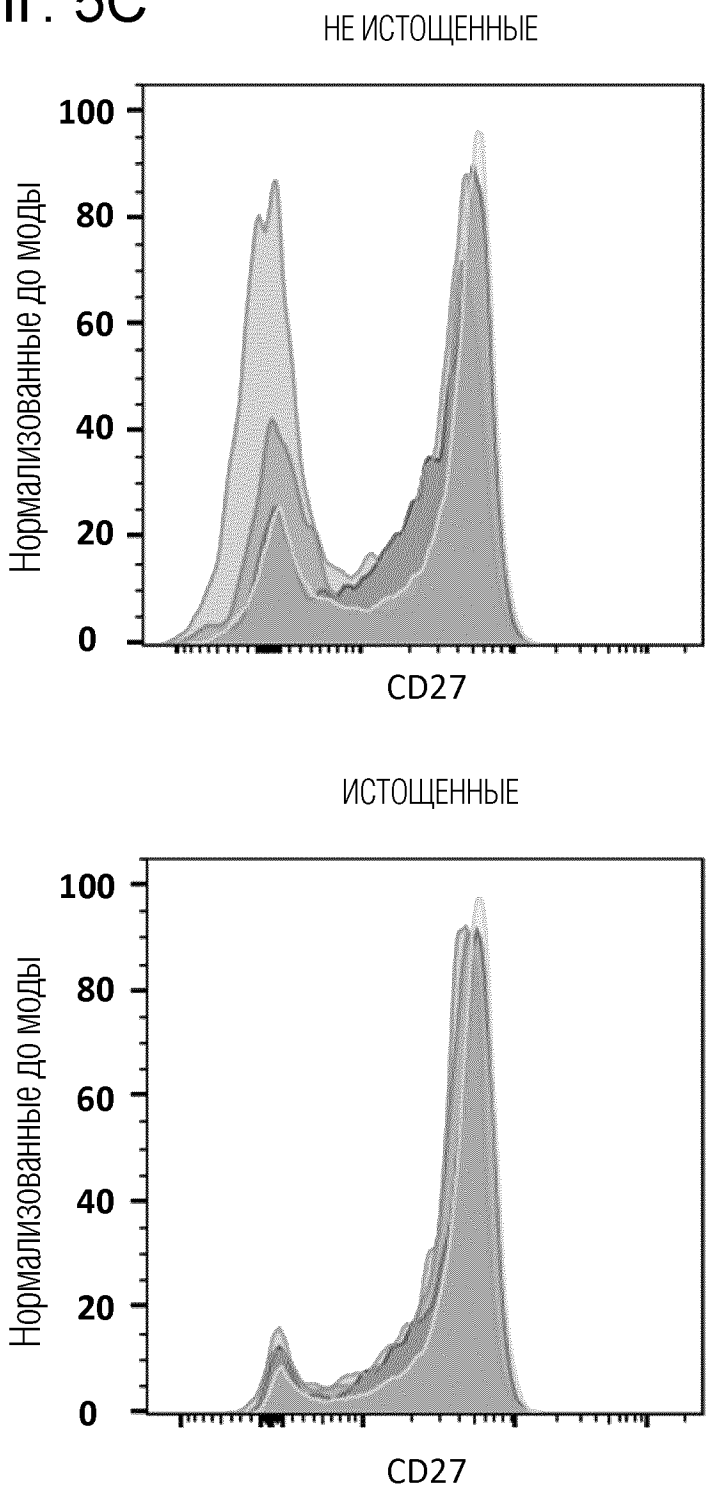
ФИГ. 5A


% CD57+ из Т-клеток
100
80
60
40
20
0
Истощенные
Не истощенные

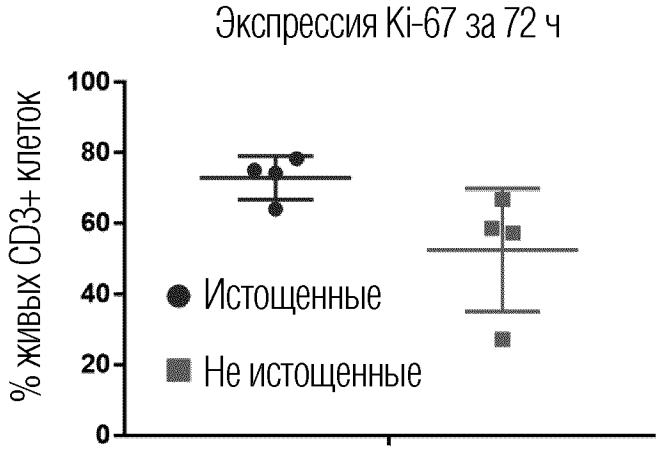
ФИГ. 5B


% CD27+CD28+ Т-клеток
100
80
60
40
20
0
Истощенные
Не истощенные

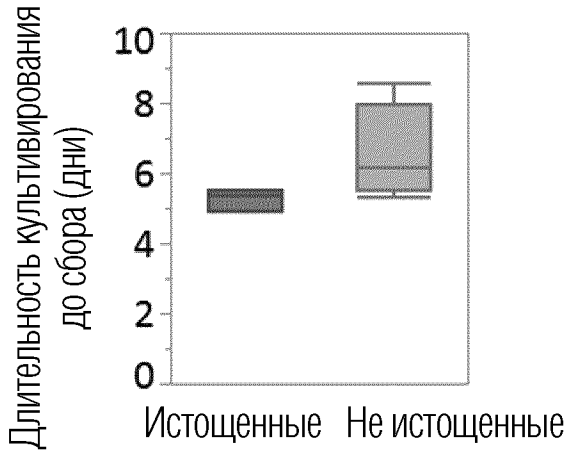
ФИГ. 5С


НЕ ИСТОЩЕННЫЕ
Нормализованные до моды
100
80
60
40
20
0
CD27
ИСТОЩЕННЫЕ
Нормализованные до моды
100
80
60
40
20
0
CD27

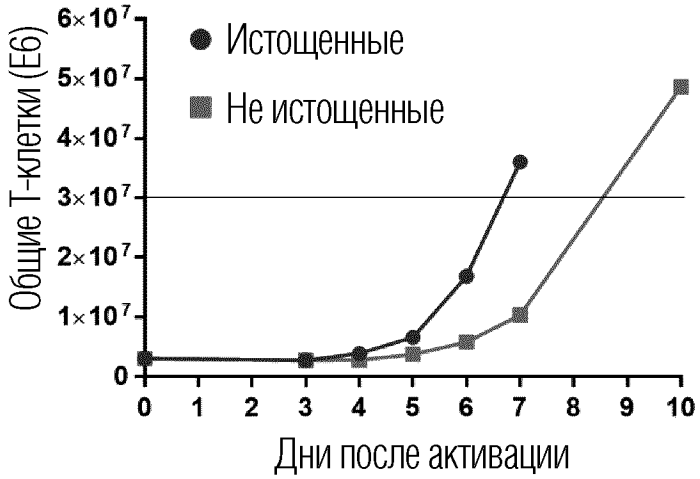
ФИГ. 5D


Экспрессия Ki-67 за 72 ч
% живых CD3+ клеток
100
80
60
40
20
0
Истощенные
Не истощенные

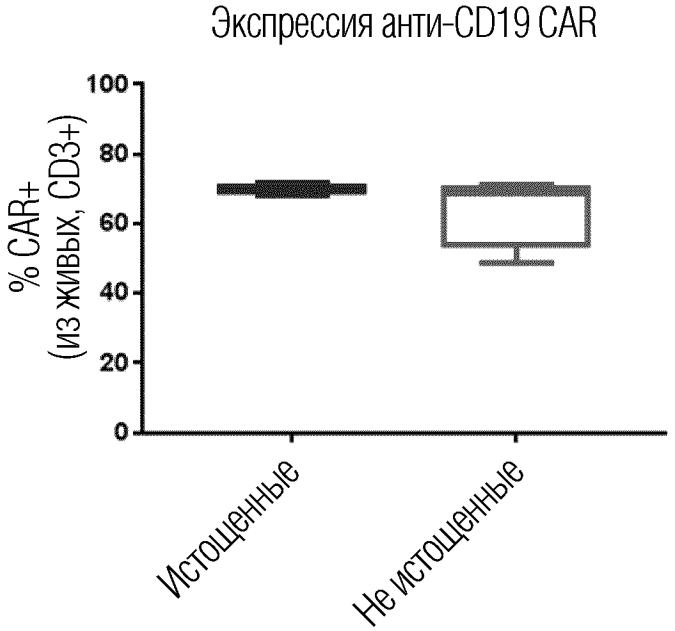
ФИГ. 5E


Длительность культивирования до сбора (дни)
10
8
6
4
2
0
Истощенные
Не истощенные

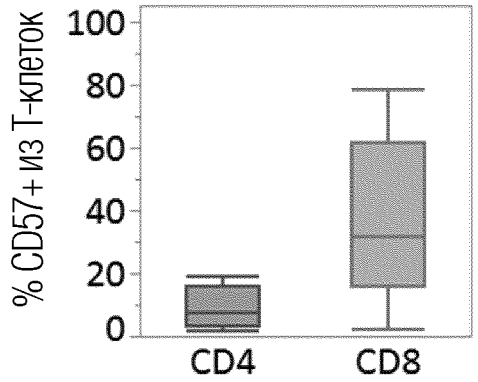
ФИГ. 5F


Общие Т-клетки (Е6)
6×10^7
5×10^7
4×10^7
3×10^7
2×10^7
1×10^7
0
Истощенные
Не истощенные
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Дни после активации

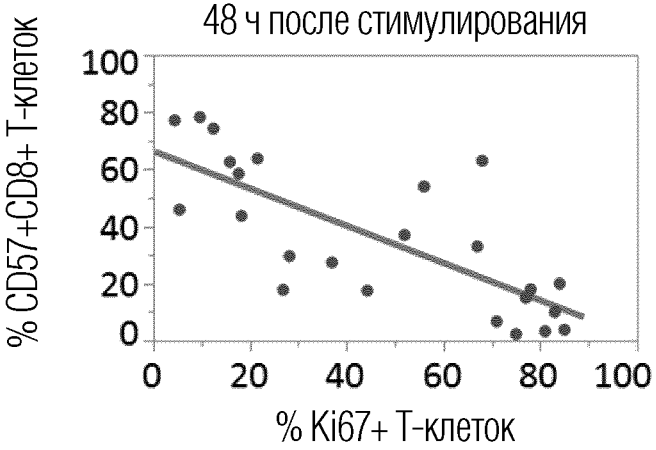
ФИГ. 5G


Экспрессия анти-CD19 CAR
% CAR+
(из живых, CD3+)
100
80
60
40
20
0
Истощенные
Не истощенные

ФИГ. 6А


% CD57+ из Т-клеток
100
80
60
40
20
0
CD4
CD8

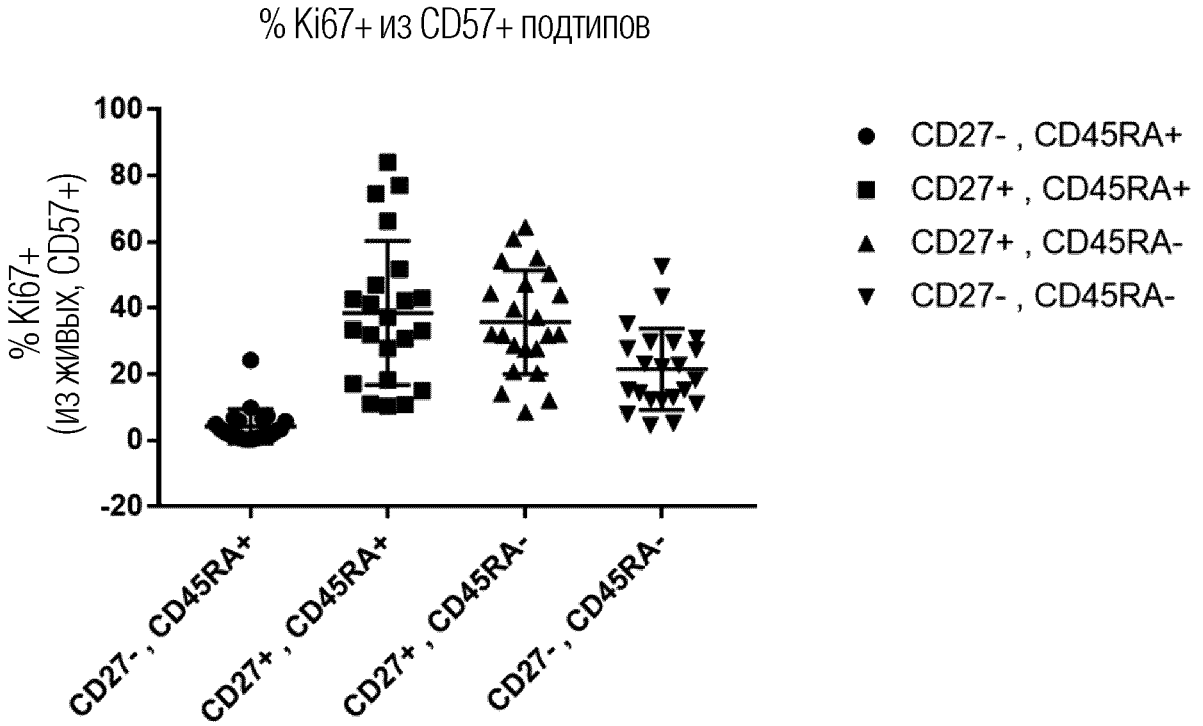
ФИГ. 6В


48 ч после стимулирования
% CD57+CD8+ Т-клеток
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
% Ki67+ Т-клеток

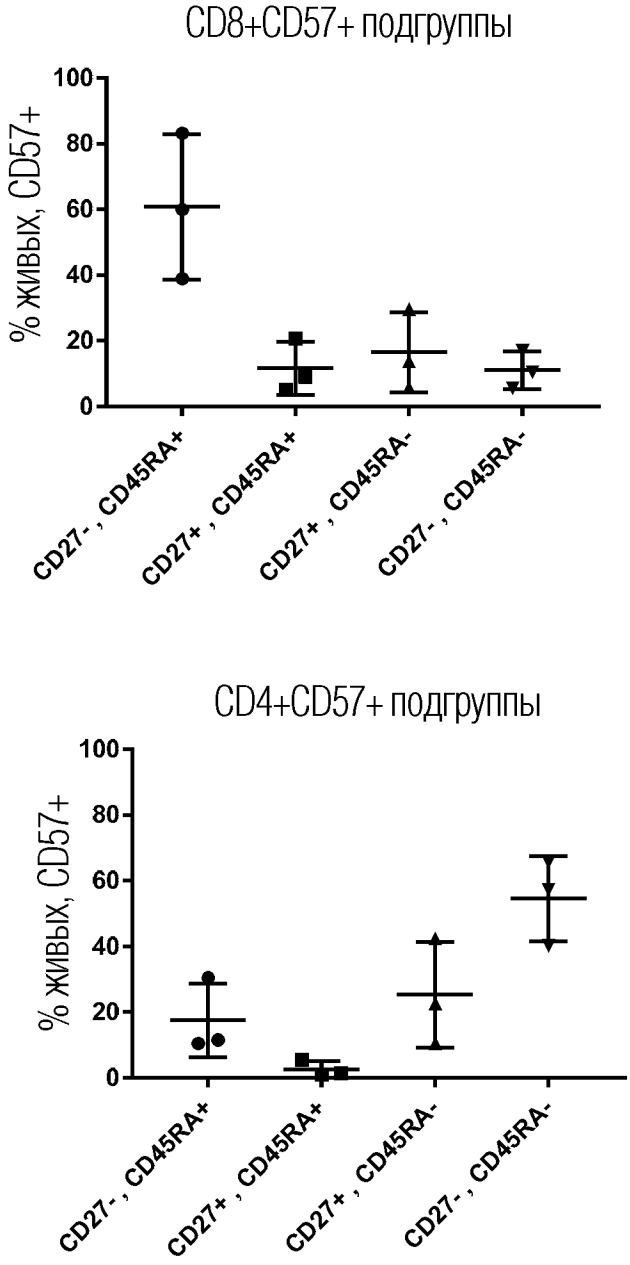
ФИГ. 6С

Масштабирование
Низкий%
Высокий%
CD8_MFI_CD45RA
CD8_CD57POS_CD27-_CD45RA+
CD8_CD27-_CD45RA+
CD8_CCR7-_CD45RA+
CD8_CD57NEG_CD27-_CD45RA+
CD8_MFI_CD57
CD8_KI67POS_CD27-_CD57+
CD8_CD57POS
CD8_KI67-_CD57+
CD8_CD27-_CD57+
CD8_KI67NEG_CD27-_CD57+
CD8_CD27NEG
CD8_CD27-_CD70-
CD8_CD28-_CD27-
CD8_KI67NEG
CD8_CD25-_CD69-
CD8_MFI_CD70
CD8_CD27+_CD70+
CD8_CD27-_CD70+
CD8_KI67POS_CD27-_CD57-
CD8_CD25+_CD69-
CD8_CD25-_CD69+
CD8_CD28+_CD27-
CD8_CD57POS_CD27-_CD45RA-
CD8_CD27-_CD45RA-
CD8_CCR7-_CD45RA-
CD8_CD57NEG_CD27-_CD45RA-
CD8_KI67POS_CD27+_CD57+
CD8_KI67+_CD57+
CD8_CD27+_CD57+
CD8_MFI_CD28
CD8_CD57POS_CD27+_CD45RA-
CD8_MFI_KI67
CD8_KI67NEG_CD27+_CD57+
CD8_MFI_CD27
CD8_CD28-_CD27+
CD8_CD27POS
CD8_KI67NEG_CD27+_CD57-
CD8_CD27+_CD57-
CD8_CD27+_CD70-
CD8_CD27+_CD45RA-
CD8_CD28+_CD27+
CD8_CD57NEG_CD27+_CD45RA-
CD8_KI67POS
CD8_KI67+_CD57-
CD8_CD25+_CD69+
CD8_MFI_CCR7
CD8_CCR7+_CD45RA-
CD8_MFI_CD69
CD8_MFI_CD25
CD8_CD57NEG
CD8_KI67-_CD57-
CD8_KI67POS_CD27+_CD57-
CD8_KI67NEG_CD27-_CD57-
CD8_CD27-_CD57-
CD8_CD57POS_CD27+_CD45RA+
CD8_CD57NEG_CD27+_CD45RA+
CD8_CD27+_CD45RA+
CD8_CCR7+_CD45RA+
Высокие %CD57+
Низкие %CD57+
Эффекторные/концевые эффекторные
Дифференциация Т-клеток
Подобные наивным/центральные памяти
Дифференциация Т-клеток

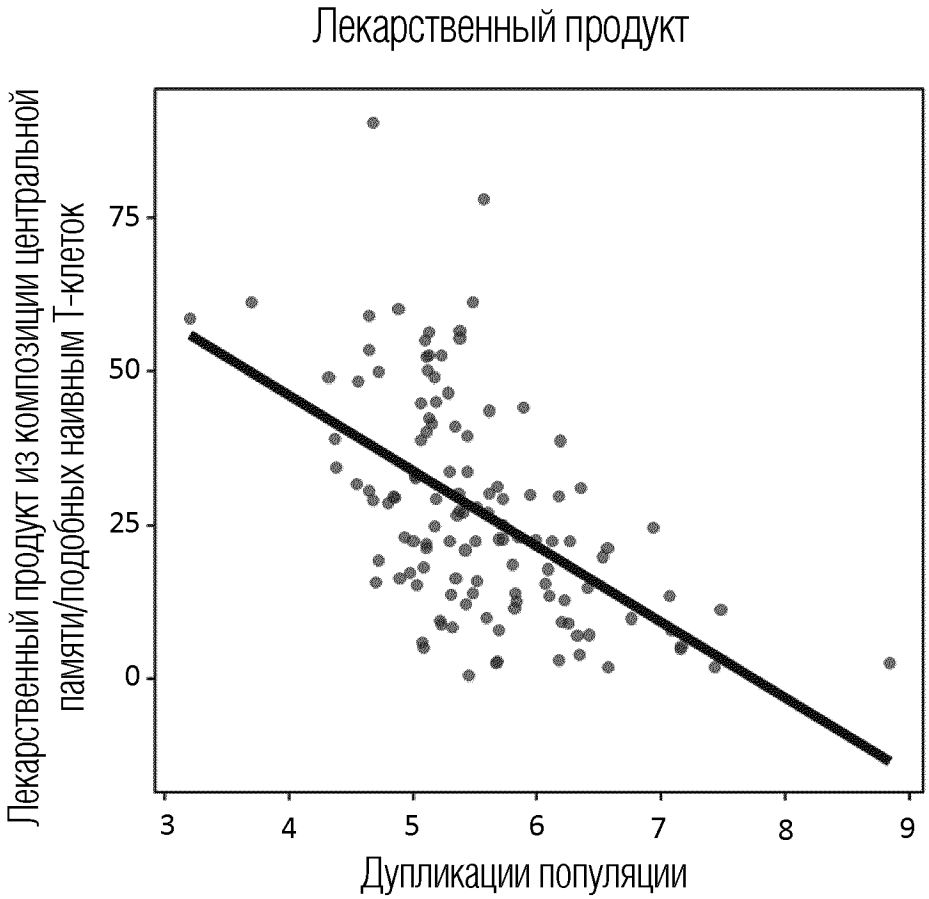
ФИГ. 6D


% Ki67+ из CD57+ подтипов
% Ki67+
(из живых, CD57+)
100
80
60
40
20
0
-20
CD27- , CD45RA+
CD27+ , CD45RA+
CD27+ , CD45RA-
CD27- , CD45RA-
CD27- , CD45RA+
CD27+ , CD45RA+
CD27+ , CD45RA-
CD27- , CD45RA-

ФИГ. 6E

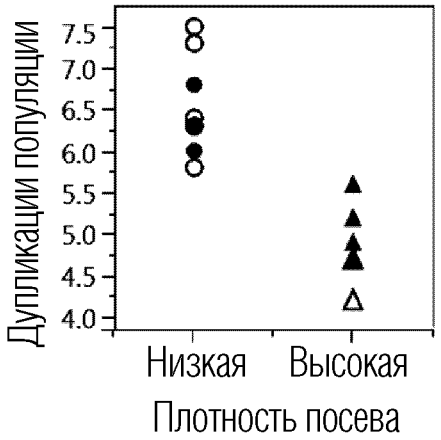

CD8+CD57+ подгруппы
% живых, CD57+
100
80
60
40
20
0
CD27- , CD45RA+
CD27+ , CD45RA+
CD27+ , CD45RA-
CD27- , CD45RA-
CD4+CD57+ подгруппы
% живых, CD57+
100
80
60
40
20
0
CD27- , CD45RA+
CD27+ , CD45RA+
CD27+ , CD45RA-
CD27- , CD45RA-

ФИГ. 7

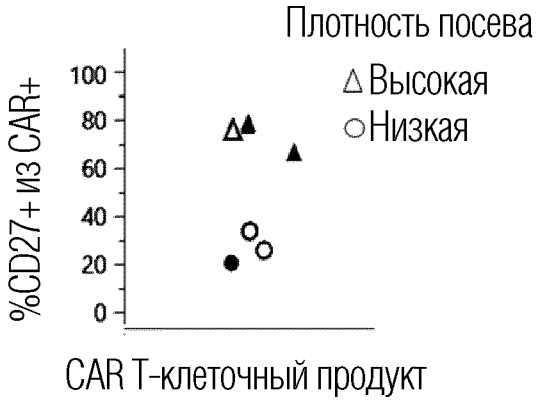


Spearman ρ	-0.54
p значение	<0.001

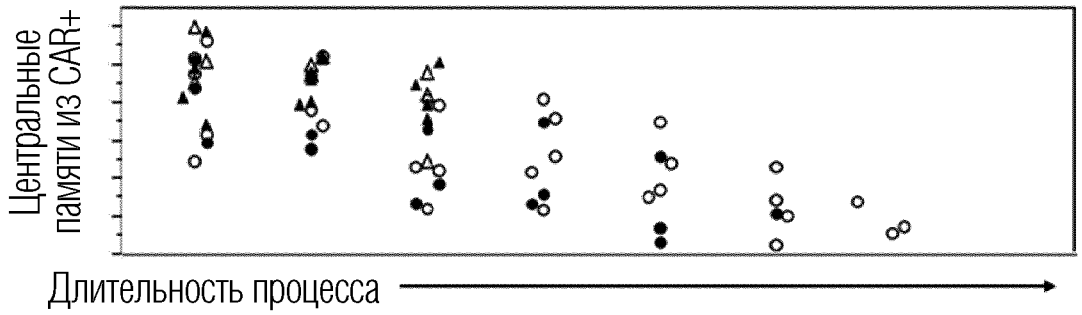
ФИГ. 8A



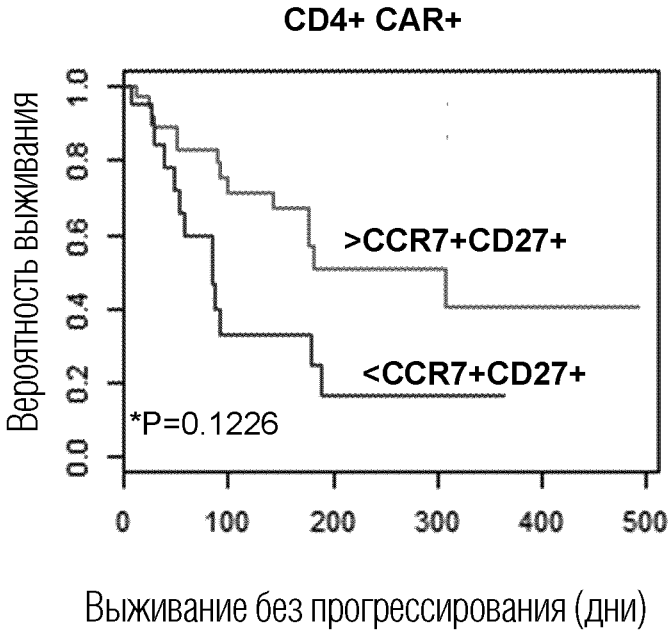
ФИГ. 8B



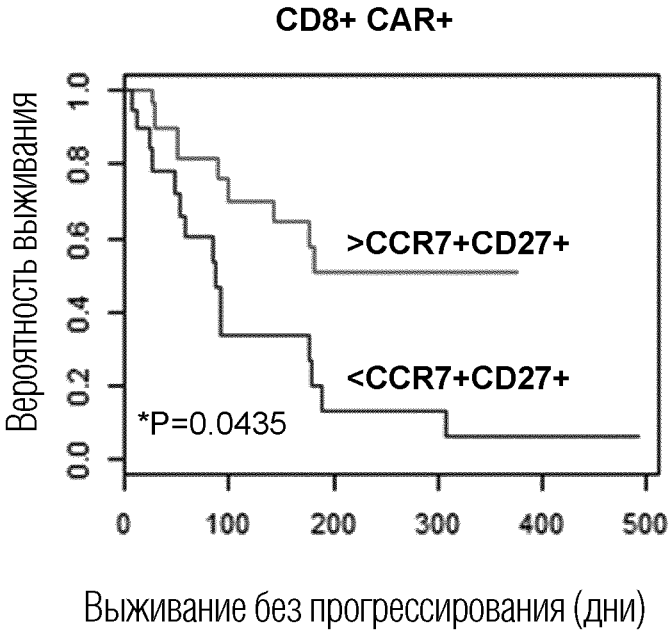
ФИГ. 8C



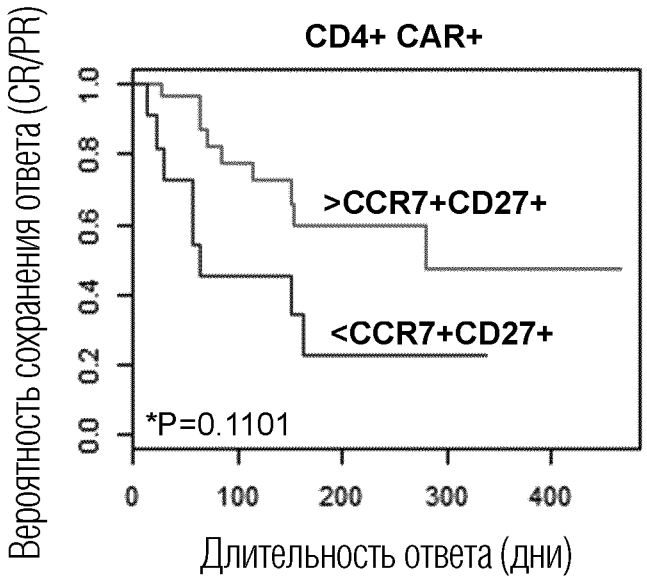
ФИГ. 9А


CD4+ CAR+
Вероятность выживания
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
>CCR7+CD27+
<CCR7+CD27+
*P=0.1226
0
100
200
300
400
500
Выживание без прогрессирования (дни)

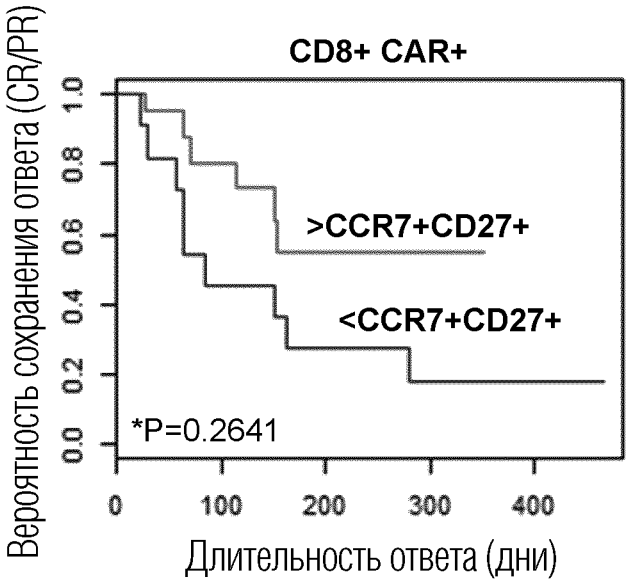
ФИГ. 9В


CD8+ CAR+
Вероятность выживания
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
>CCR7+CD27+
<CCR7+CD27+
*P=0.0435
0
100
200
300
400
500
Выживание без прогрессирования (дни)

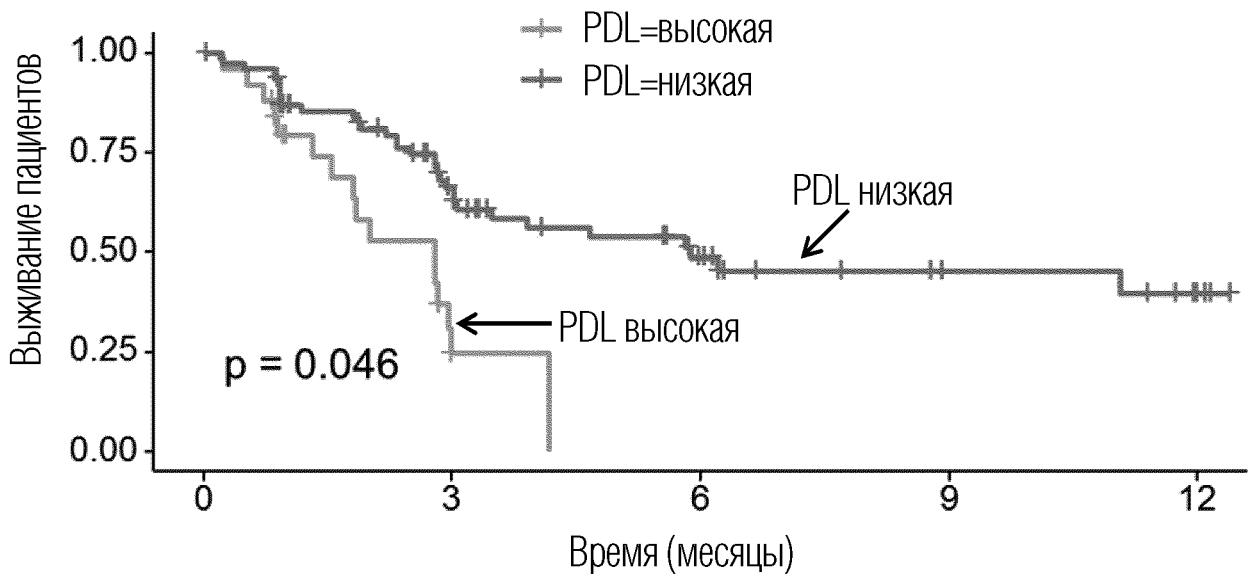
ФИГ. 9C


CD4+ CAR+
Вероятность сохранения ответа (CR/PR)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
>CCR7+CD27+
<CCR7+CD27+
*P=0.1101
0
100
200
300
400
Длительность ответа (дни)

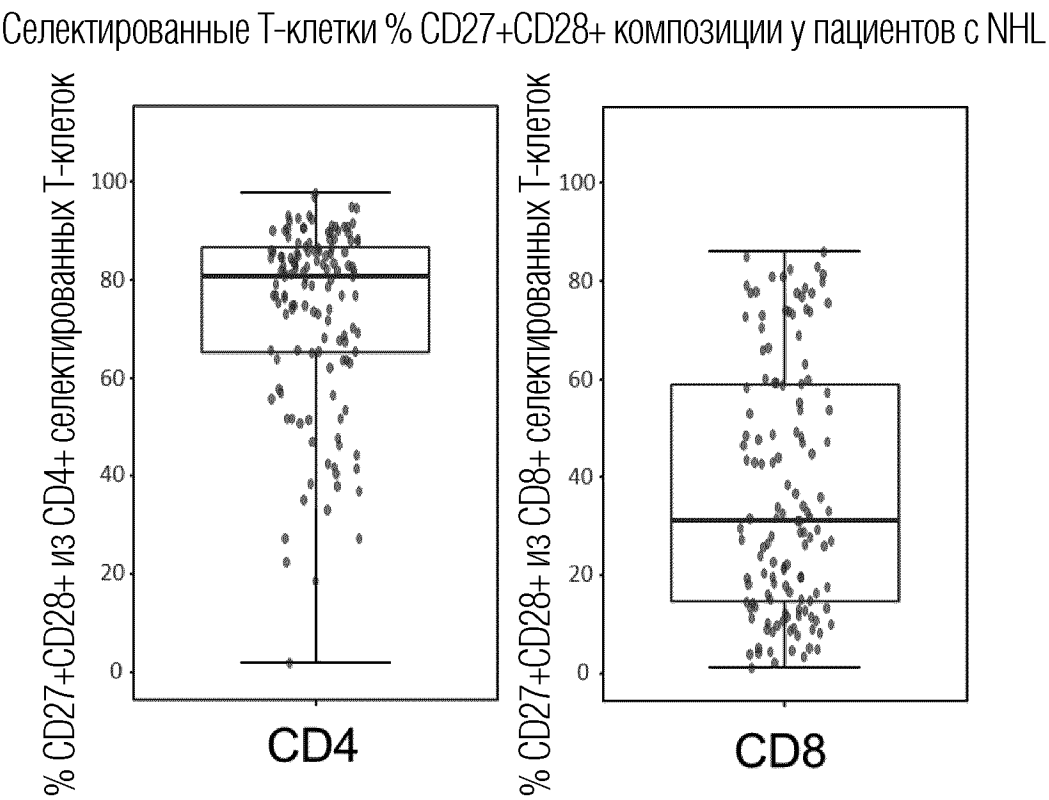
ФИГ. 9D


CD8+ CAR+
Вероятность сохранения ответа (CR/PR)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
>CCR7+CD27+
<CCR7+CD27+
*P=0.2641
0
100
200
300
400
Длительность ответа (дни)

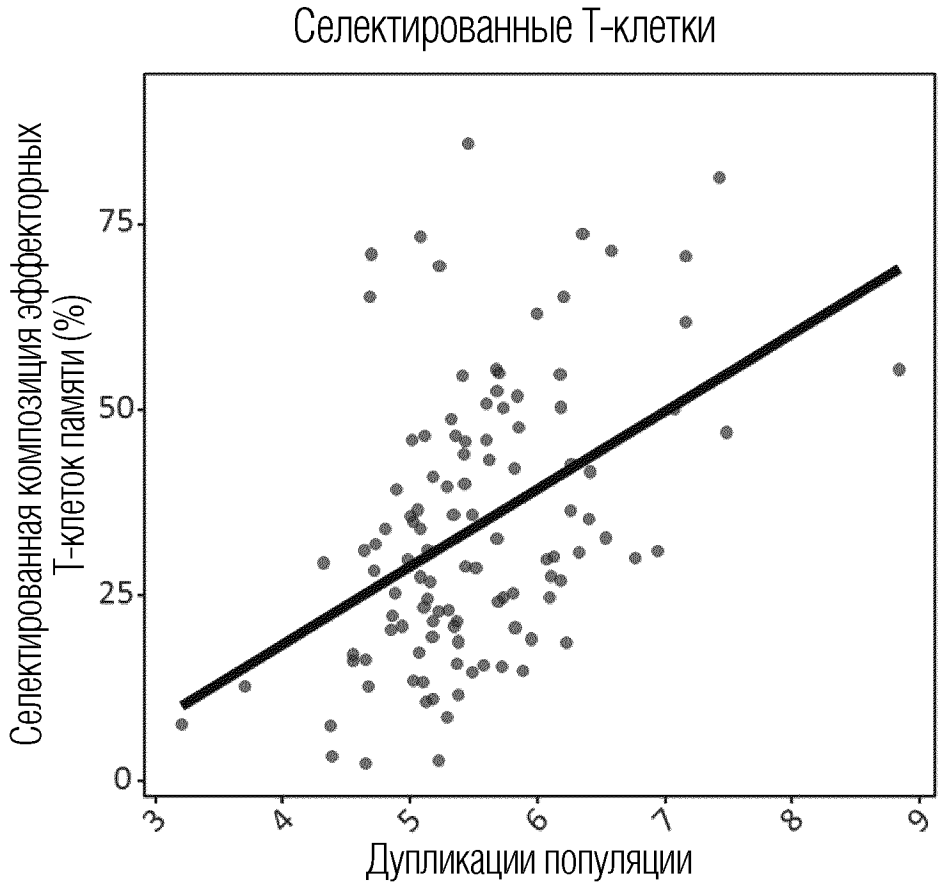
ФИГ. 10


PDL=высокая
PDL=низкая
Выживание пациентов
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
PDL низкая
PDL высокая
p = 0.046
0
3
6
9
12
Время (месяцы)

ФИГ. 11

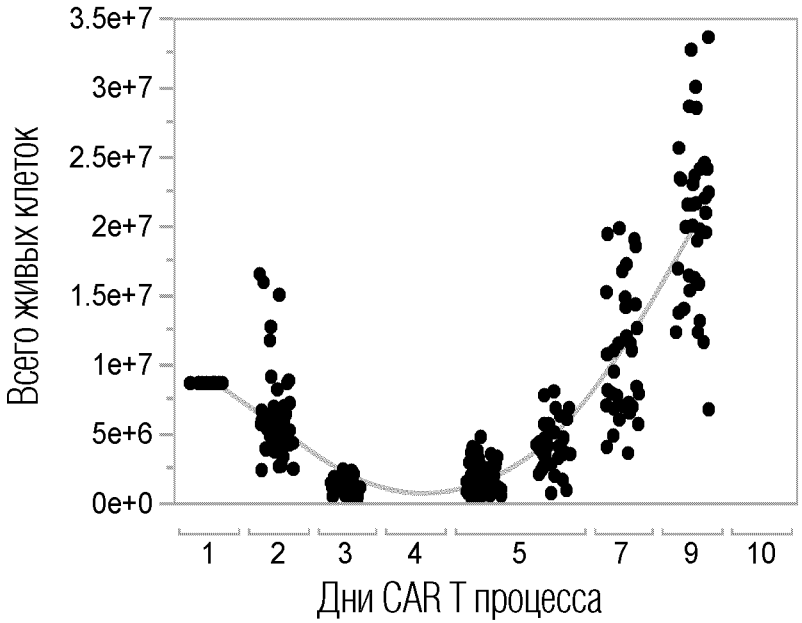

Селектированные Т-клетки % CD27+CD28+ композиции у пациентов с NHL
% CD27+CD28+ из CD4+ селектированных Т-клеток
100
80
60
40
20
0
CD4
% CD27+CD28+ из CD8+ селектированных Т-клеток
100
80
60
40
20
0
CD8

ФИГ. 12

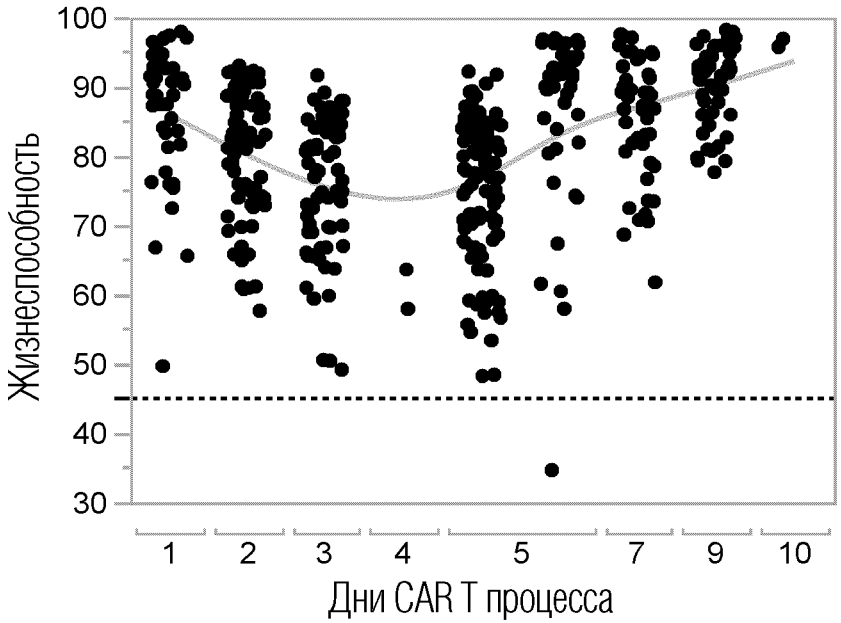


Spearman ρ	0.43
p значение	<0.001

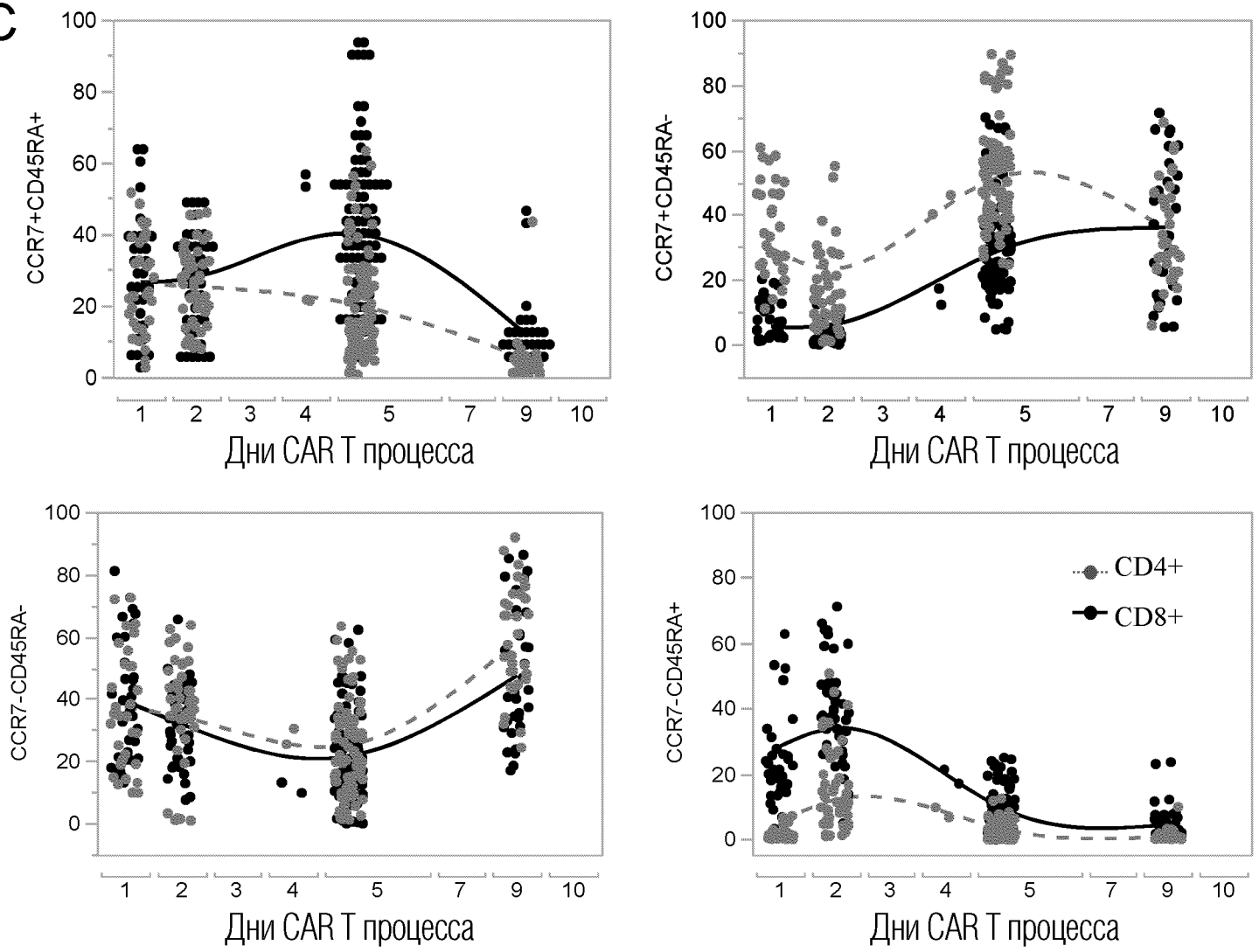
ФИГ. 13А



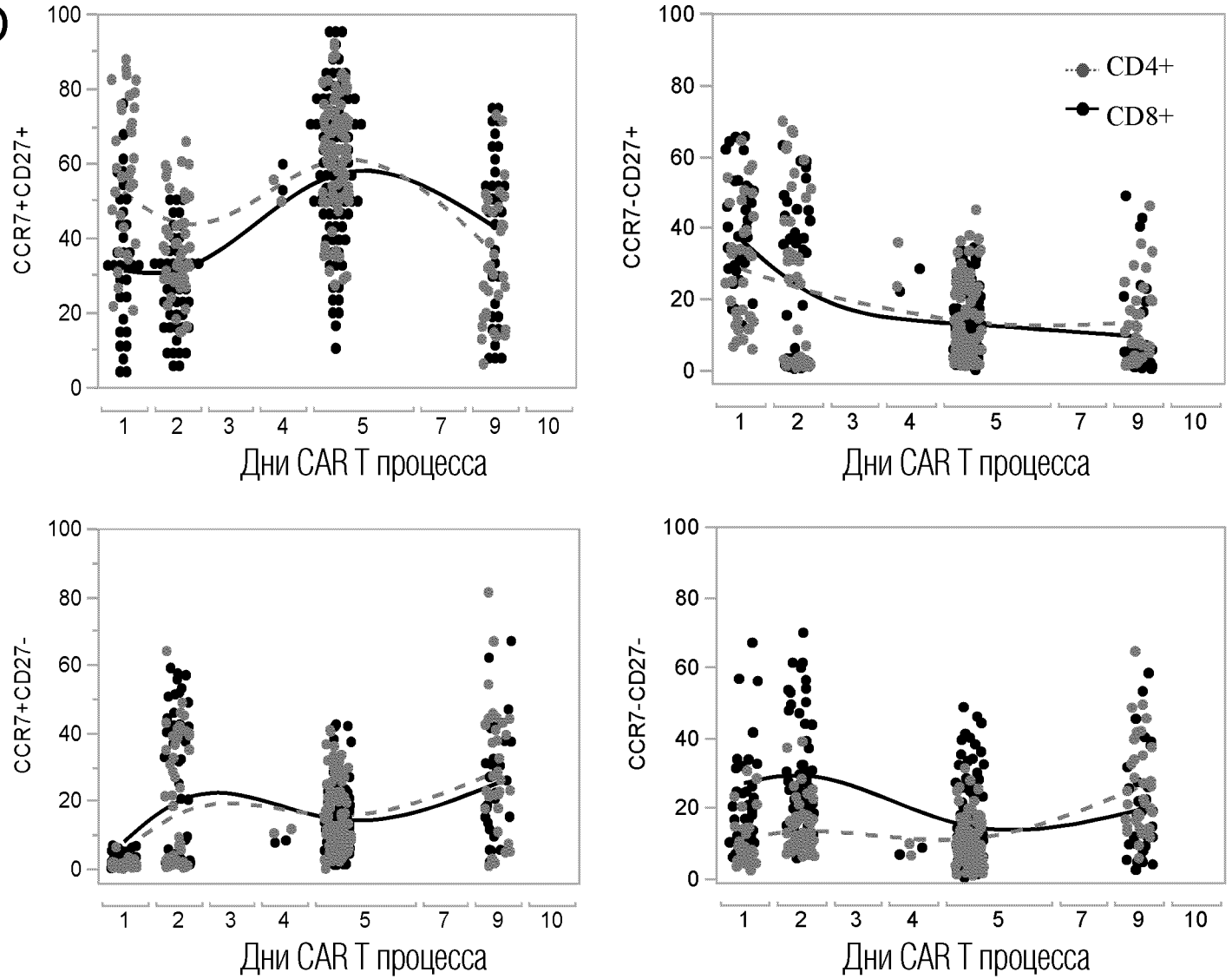
ФИГ. 13В



ФИГ. 13C


CCR7+CD45RA+
CCR7+CD45RA-
CCR7-CD45RA-
CCR7-CD45RA+
Дни CAR T процесса
CD4+
CD8+
0
20
40
60
80
100
1
2
3
4
5
7
9
10

ФИГ. 13D


CCR7+CD27+
CCR7-CD27+
CCR7+CD27-
CCR7-CD27-
CD4+
CD8+
Дни CAR T процесса
0
20
40
60
80
100
1
2
3
4
5
7
9
10

ФИГ. 14