

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191338** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.08.10

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.11.15

(54) **УЛУЧШЕННЫЙ СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА Т-КЛЕТОК**

(31) **62/768,579**

(32) **2018.11.16**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/061723**

(87) **WO 2020/102676 2020.05.22**

(71) Заявитель:
СЕЛДЖИН КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:

**Брива Томас А., Хсиун Дэвид, Джонс
Сет, Мистри Шив, Раджаи Найере
(US)**

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

(57) В настоящем изобретении предложены улучшенные способы производства клеток, включая Т-клетки и CAR-Т-клетки. В настоящем изобретении также предложены способы производства клеток, таких как Т-клетки и CAR-Т-клетки, полученных из крови с использованием способа, включающего мембранную фильтрацию и аммоний-хлорид-калиевый буфер (АХК) для выделения клеток из других компонентов крови.

A1

202191338

202191338

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568765EA/025

УЛУЧШЕННЫЙ СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА Т-КЛЕТОК

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[01] Данная заявка испрашивает преимущество предварительной заявки на патент США № 62/768579 поданной 16 ноября 2018 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

1. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[02] Настоящее изобретение относится к области медицины, в частности, получению клеточных способов лечения рака.

2. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[03] Иммуноterapia, основанная на Т-клетках, экспрессирующих искусственный рецептор, *например*, химерный антигенный рецептор или Т-клеточный рецептор (TCR), полипептидах, которые нацеливают Т-клетки на конкретный опухоль-ассоциированный антиген, и обеспечивающая первичную и общую костимулирующую передачу сигналов для активации и повышения пролиферации Т-клетки становится все более многообещающим способом лечения, особенно для пациентов, которые исчерпали другие способы лечения. Тем не менее, для терапии на основе аутологичных CAR-T-клеток производство клеток по-прежнему является трудоемким и занимает много времени. В результате в данной области техники существует потребность в улучшенных способах производства CAR-T-клеток, которые будут снижать время и стоимость получения таких клеток. В настоящем документе представлен такой улучшенный способ.

3. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[04] В первом аспекте настоящего документа предложены способы производства клеток, получаемых из крови с использованием способа, включающего мембранную фильтрацию и аммоний-хлорид-калиевый буфер (АХК) для отделения клеток от других компонентов крови. В первом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства клеток из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) субъекта, от которого получают образец крови, включающий следующие стадии: (a) получение клеток крови из образца крови, например, с использованием лейкофереза или забора крови, с получением мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК); (b) необязательное замораживание клеток крови и получение МКПК после оттаивания, или необязательное получение и замораживание МКПК с последующим оттаиванием перед последующими стадиями; (c) выделение МКПК с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (d) промывание МКПК посредством центрифугирования; (e) необязательную криоконсервацию МКПК; (f) необязательное оттаивание МКПК, если МКПК подвергали криоконсервации (e); (g) промывание МКПК с использованием системы мембранной фильтрации; (h) производство клеток из МКПК; и (i) промывание клеток с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(h) в указанном способе

осуществляют по порядку. В конкретном варианте осуществления клетки представляют собой экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клетки (CAR-Т-клетки).

[05] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток) из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) субъекта, от которого получен образец крови, включающий следующие стадии: (a) получение МКПК из образца крови; (b) выделение МКПК, которые были получены из образца крови с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (c) промывание МКПК посредством центрифугирования; (d) необязательная криоконсервация МКПК; (e) необязательное оттаивание МКПК, подвергнутых криоконсервации на стадии (d); (f) промывание МКПК с использованием системы мембранной фильтрации; (g) производство CAR-Т-клеток из МКПК со стадии (f); и (h) промывание CAR-Т-клеток со стадии (g) с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(h) в указанном способе осуществляют по порядку.

[06] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток) из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) субъекта, от которого получен образец крови, включающий следующие стадии: (a) выделение МКПК, полученных из образца крови субъекта, причем для указанного выделения применяют систему мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевый буфер (АХК); (b) промывание МКПК посредством центрифугирования; (c) необязательную криоконсервацию МКПК; (d) необязательное оттаивание МКПК, подвергнутых криоконсервации на стадии (c); (e) промывание МКПК с использованием системы мембранной фильтрации; (f) производство CAR-Т-клеток из МКПК со стадии (f); и (g) промывание CAR-Т-клеток со стадии (f) с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(g) в указанном способе осуществляют по порядку.

[07] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства клеток из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) из образца крови субъекта, включающий следующие стадии: (a) выделение МКПК из образца крови субъекта, причем образец крови представляет собой подвергнутый лейкоферезу образец крови или полученный посредством забора крови образец крови, с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (b) необязательную криоконсервацию МКПК со стадии (a); (c) необязательное оттаивание МКПК со стадии (b); (d) промывание оттаянных МКПК со стадии (c) с использованием системы мембранной фильтрации; (e) производство клеток из МКПК со стадии (d); и (f) промывание клеток со стадии (e) с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(f) в указанном способе

осуществляют по порядку. В конкретном варианте осуществления клетки представляют собой экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клетки (CAR-Т-клетки).

[08] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства клеток из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) из образца крови субъекта, включающий следующие стадии: (a) выделение МКПК из образца крови субъекта, причем образец крови представляет собой подвергнутый лейкоферезу образец крови или полученный посредством забора крови образец крови, с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (b) криоконсервацию МКПК со стадии (a); (c) оттаивание МКПК со стадии (b); (d) промывание оттаянных МКПК со стадии (c) с использованием системы мембранной фильтрации; (e) производство клеток из МКПК со стадии (d) ; и (f) промывание клеток со стадии (e) с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(f) в указанном способе осуществляют по порядку. В конкретном варианте осуществления клетки представляют собой экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клетки (CAR-Т-клетки).

[09] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства клеток из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) из образца крови субъекта, включающий следующие стадии: (a) выделение МКПК из образца крови субъекта с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (b) необязательную криоконсервацию и оттаивание МКПК со стадии (a); (c) необязательное промывание оттаянных МКПК со стадии (b) с использованием системы мембранной фильтрации; (d) производство клеток из МКПК; и (e) промывание клеток с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(e) в указанном способе осуществляют по порядку. В конкретном варианте осуществления образец крови представляет собой подвергнутый лейкоферезу образец крови. В конкретном варианте осуществления клетки представляют собой экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клетки (CAR-Т-клетки).

[010] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства клеток из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) из образца крови субъекта, включающий следующие стадии: (a) выделение МКПК из образца крови субъекта с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (b) криоконсервацию и оттаивание МКПК со стадии (a); (c) промывание оттаянных МКПК со стадии (b) с использованием системы мембранной фильтрации; (d) производство клеток из МКПК; и (e) промывание клеток с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(e) в указанном способе осуществляют по порядку. В конкретном варианте осуществления образец крови представляет собой подвергнутый лейкоферезу образец крови. В конкретном варианте осуществления клетки представляют собой

экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клетки (CAR-Т-клетки).

[011] В конкретных вариантах осуществления любого из указанных выше вариантов осуществления клетки представляют собой Т-клетки (Т-лимфоциты), естественные клетки-киллеры (NK-клетки) или дендритные клетки. В конкретных вариантах осуществления Т-клетки представляют собой цитотоксичные Т-лимфоциты (CTL), CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, или центральные Т-клетки памяти (T_{cm}). В конкретных вариантах осуществления клетки, *например*, Т-клетки, были генетически модифицированы для экспрессии полипептида, *например*, химерного рецептора. В более конкретных вариантах осуществления химерный рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор. В более конкретных вариантах осуществления клетки в любом из указанных выше способов представляют собой экспрессирующие химерный антигенный рецептор Т-клетки (CAR-Т-клетки).

[012] В конкретных вариантах осуществления любого из приведенных выше вариантов осуществления, по меньшей мере одна или все системы мембранной фильтрации представляют собой систему тангенциальной проточной фильтрации. В конкретных вариантах осуществления любого из указанных выше вариантов осуществления по меньшей мере одна или все системы мембранной фильтрации может представлять собой вращающуюся систему мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления любого из указанных выше вариантов осуществления система мембранной фильтрации представляет собой вращающуюся систему мембранной фильтрации, такую как автоматизированная система обработки клеток LOVO. В другом конкретном варианте осуществления любого из указанных выше вариантов осуществления буфер АХК содержит 50-300 ммоль хлорида аммония, 5-25 ммоль карбоната калия и 0,05-0,25 ммоль эдетата натрия. В более конкретном варианте осуществления указанных буфер АХК содержит 150 ммоль хлорида аммония, 10 ммоль карбоната калия и 0,1 ммоль эдетата натрия. В другом конкретном варианте осуществления любого из указанных выше вариантов осуществления указанный способ улучшает снижение уровня тромбоцитов и эритроцитов в МКПК на 18%-36% по сравнению с тем же способом с использованием центрифугирования в градиенте плотности вместо каждого применения вращающейся мембранной фильтрации. В другом конкретном варианте осуществления любого из указанных выше вариантов осуществления указанный способ улучшает снижение уровня тромбоцитов и эритроцитов в указанных МКПК на 10%-50%, 15%-45%, 20%-40%, 20%-35%, 20%-30%, 25%-35%, 25%-30%, 25%-40% или 30-35% по сравнению с тем же способом с использованием центрифугирования в градиенте плотности вместо каждого применения вращающейся мембранной фильтрации. В другом конкретном варианте осуществления любого из указанных выше вариантов осуществления указанный способ улучшает извлечение клеток, *например*, CAR-Т-клеток, после производства Т-клеток на 17%-36% по сравнению с тем же способом с использованием центрифугирования в градиенте плотности вместо каждого применения вращающейся мембранной фильтрации. В другом конкретном

варианте осуществления любого из указанных выше вариантов осуществления указанных способ улучшает извлечение клеток, *например*, CAR-T-клеток, после производства T-клеток на около 10%-50%, 15%-45%, 20%-40%, 20%-35%, 20%-30%, 25%-35%, 25%-30%, 25%-40% или 30-35%, по сравнению с тем же способом с использованием центрифугирования в градиенте плотности вместо каждого применения вращающейся мембранной фильтрации.

4. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

4.1. Улучшенный способ получения клеток - обзор

[013] В настоящем документе представлен способ производства клеток, который включает улучшенный способ получения клеток. Способ производства начинали с выделения аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) из образца полученного посредством лейкофереза или из образца полученного посредством забора крови у пациента.

[014] Способ производства начинали с выделения МКПК из образца полученного посредством лейкофереза или из образца полученного посредством забора крови у пациента. Аутологичные МКПК выделяли из образца полученного посредством лейкофереза или из образца полученного посредством забора крови у пациента посредством системы мембранной фильтрации, *например*, вращающейся системы мембранной фильтрации, *например*, с размером пор 3,6 мкм, *например*, для удаления тромбоцитов и клеточного дебриса. После удаления тромбоцитов и клеточного дебриса для лизиса эритроцитов применяли аммоний-хлорид-калиевый буфер (АХК). Затем МКПК отделяли от раствора буфера АХК и промывали посредством центрифугирования. Данная комбинация вращающейся мембранной фильтрации с последующим лизисом АХК RBC представляет первое улучшение более раннего способа, в котором применяли центрифугирование с градиентом плотности (Cell-Saver 5+ (CS5+; Haemonetics, Брэйнтри, Массачусетс)).

[015] После промывания выделенные МКПК повторно суспендировали, а затем включали в подходящий раствор, *например*, Cryostor. В качестве альтернативы, T-клетки (или NK-клетки, или дендритные клетки) могут быть выделены из МКПК перед включением в такой раствор. В случае T-клеток, для выделения T-клеток можно применять магнитные бусы, такие как Dynabeads, покрытые антителами к CD3, антителами к CD4 или антителами к CD8. Полученные растворы МКПК или выделенные клетки затем можно замораживать с использованием программируемого криоамораживателя, хранить и выпускать. За данной стадией может следовать стадия культивирования клеток. *Например*, можно применять водяную ванну с температурой 37°C в день, определенный как день 0, для оттаивания криоконсервированных МКПК или выделенных клеток перед промыванием и повторным суспендированием клеток в питательной среде, подходящей для выращивания таких клеток, с использованием системы мембранной фильтрации, *например*, вращающейся системы мембранной фильтрации или центрифугирования. Предпочтительная питательная среда для T-клеток

(TCGM) содержит 93% (об./об.) клеточной культуральной среды X-VIVO-15 (Lonza), 10 ммоль HEPES, 2 ммоль GlutaMAX™, 5% (об./об.) сыворотки АВ человека и 100 МЕ/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (rhIL-2) (см. Hollyman et al, J Immunother 2009, 32:169-180).

[016] Культура может быть иницирована и активирована посредством посева изолированных МКПК в газопроницаемый мешок для дифференцирования клеток в концентрации 1×10^6 МКПК/мл в среде, *например*, TCGM, с добавлением реагентов активации (*например*, для Т-клеток, Dynabeads, покрытых антителами к CD3 и антителами к CD28). Затем клетки могут инкубироваться при 37°C, предпочтительно, в воздухе с 5% CO₂. В случае CAR-Т-клеток такая инкубация может продолжаться до трансдукции Т-клеток посредством CAR-экспрессирующего вектора. Активации Т-клеток можно измерять посредством увеличением размера клеток (клеточного бластинга) и клеточной кластеризации. Размер клеток (индикатор активации) можно контролировать после инициации культивирования с использованием, *например*, способа Коултера.

[017] Для производства CAR-Т-клеток трансдукцию экспрессирующим CAR вектором можно осуществлять посредством разведения указанного объема вектора в среде, *например*, TCGM, которую затем добавляют в клеточную культуру. Объем вектора может быть выбран на основе количества МКПК, высеванных в день 0, вирусного титра применяемой партии векторов и целевой множественности инфекции (MOI). Целевая MOI в определенных вариантах осуществления является специфической для партии вектора и выбирается для достижения сопоставимых результатов от партии к партии. Затем клетки инкубируют при 37°C с 5% CO₂.

[018] После трансдукции указанным вектором указанную культуру инкубируют и оставляют для размножения в течение некоторого периода и при целевой плотности посеивания. Затем культуру можно повторно посеивать, *например*, в газопроницаемые мешки для размножения клеток или другой культуральный мешок, такой как биореактор WAVE™, и инкубировать.

[019] Затем, *например*, в день 10, клетки собирали и промывали с использованием системы мембранной фильтрации, *например*, вращающейся системы мембранной фильтрации, а затем в асептических условиях с использованием закрытой системы переносили культуру в мешок для переработки в готовый лекарственный продукт. Это представляет собой третье улучшение по сравнению с предыдущим исходным способом, в котором для последней промывки применяли устройство CS5+.

[020] Для любой из вышеуказанных стадий с использованием вращающегося мембранного фильтра предпочтительным устройством является автоматизированная система обработки клеток LOVO (Fresenius Kabi).

[021] В конкретном варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства CAR-Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) субъекта, от которого получают образец крови, включающий следующие стадии: (а) получение клеток крови из образца крови, например, с использованием лейкофереза

или забора крови с получением мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК); (b) необязательное замораживание клеток крови и получение МКПК после оттаивания, или необязательное получение и замораживание МКПК с последующим оттаиванием перед последующими стадиями; (c) выделение МКПК с использованием системы мембранной фильтрации, например, вращающейся системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (d) промывание МКПК посредством центрифугирования; (e) необязательную криоконсервацию МКПК; (f) необязательное оттаивание МКПК, если МКПК подвергают криоконсервации на стадии (e); (g) промывание МКПК с использованием системы мембранной фильтрации, например, вращающейся системы мембранной фильтрации; (h) производство клеток из МКПК; и (i) промывание клеток с использованием системы мембранной фильтрации, например, вращающейся системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(d) и (g)-(i) в указанном способе осуществляют по порядку. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(i) в указанном способе осуществляют по порядку.

[022] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток) из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) субъекта, от которого получен образец крови, включающий следующие стадии: (a) получение МКПК из образца крови; (b) выделение МКПК, которые были получены из образца крови с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (c) промывание МКПК посредством центрифугирования; (d) необязательная криоконсервация МКПК; (e) необязательное оттаивание МКПК, подвергнутых криоконсервации на стадии (d); (f) промывание МКПК с использованием системы мембранной фильтрации; (g) производство CAR-Т-клеток из МКПК со стадии (f); и (h) промывание CAR-Т-клеток со стадии (g) с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(h) в указанном способе осуществляют по порядку.

[023] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток) из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) субъекта, от которого получен образец крови, включающий следующие стадии: (a) выделение МКПК, полученных из образца крови субъекта, причем для указанного выделения применяют систему мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевый буфер (АХК); (b) промывание МКПК посредством центрифугирования; (c) необязательную криоконсервацию МКПК; (d) необязательное оттаивание МКПК, подвергнутых криоконсервации на стадии (c); (e) промывание МКПК с использованием системы мембранной фильтрации; (f) производство CAR-Т-клеток из МКПК со стадии (f); и (g) промывание CAR-Т-клеток со стадии (f) с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(g) в указанном способе осуществляют по порядку.

[024] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства клеток из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) из образца крови субъекта, включающий следующие стадии: (a) выделение МКПК из образца крови субъекта, причем образец крови представляет собой подвергнутый лейкоферезу образец крови или полученный посредством забора крови образец крови, с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (b) необязательную криоконсервацию МКПК со стадии (a); (c) необязательное оттаивание МКПК со стадии (b); (d) промывание оттаянных МКПК со стадии (c) с использованием системы мембранной фильтрации; (e) производство клеток из МКПК со стадии (d); и (f) промывание клеток со стадии (e) с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(f) в указанном способе осуществляют по порядку. В конкретном варианте осуществления клетки представляют собой экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клетки (CAR-Т-клетки).

[025] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства клеток из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) из образца крови субъекта, включающий следующие стадии: (a) выделение МКПК из образца крови субъекта, причем образец крови представляет собой подвергнутый лейкоферезу образец крови или полученный посредством забора крови образец крови, с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (b) криоконсервацию МКПК со стадии (a); (c) оттаивание МКПК со стадии (b); (d) промывание оттаянных МКПК со стадии (c) с использованием системы мембранной фильтрации; (e) производство клеток из МКПК со стадии (d); и (f) промывание клеток со стадии (e) с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(f) в указанном способе осуществляют по порядку. В конкретном варианте осуществления клетки представляют собой экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клетки (CAR-Т-клетки).

[026] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства клеток из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) из образца крови субъекта, включающий следующие стадии: (a) выделение МКПК из образца крови субъекта с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (b) необязательную криоконсервацию и оттаивание МКПК со стадии (a); (c) необязательное промывание оттаянных МКПК со стадии (b) с использованием системы мембранной фильтрации; (d) производство клеток из МКПК; и (e) промывание клеток с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления образец крови представляет собой подвергнутый лейкоферезу образец крови. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(e) в указанном способе осуществляют по порядку.

[027] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ производства клеток из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) из

образца крови субъекта, включающий следующие стадии: (a) выделение МКПК из образца крови субъекта с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (b) криоконсервацию и оттаивание МКПК со стадии (a); (c) промывание оттаянных МКПК со стадии (b) с использованием системы мембранной фильтрации; (d) производство клеток из МКПК; и (e) промывание клеток с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления образец крови представляет собой подвергнутый лейкоферезу образец крови. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(e) в указанном способе осуществляют по порядку.

[028] В конкретном варианте осуществления в настоящем документе предложен способ получения моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) от субъекта, от которого получают образец крови для производства экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток), включающий следующие стадии: (a) получение клеток крови из образца крови, например, с использованием лейкофереза или забора крови с получением моноклеарных клеток периферической крови (МКПК); (b) необязательное замораживание клеток крови и получение МКПК после оттаивания, или необязательное получение и замораживание МКПК с последующим оттаиванием перед последующими стадиями; (c) выделение МКПК с использованием системы мембранной фильтрации, например, вращающейся системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (d) промывание МКПК посредством центрифугирования; (e) необязательную криоконсервацию МКПК; (f) необязательное оттаивание МКПК, если МКПК подвергают криоконсервации на стадии (e); и (g) промывание МКПК с использованием системы мембранной фильтрации, например, вращающейся системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(d) осуществляют по порядку. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(g) в указанном способе осуществляют по порядку.

[029] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ получения моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) от субъекта, от которого получают образец крови для производства экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток), включающий следующие стадии: (a) получение МКПК из образца крови; (b) выделение МКПК, которые были получены из образца крови с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (c) промывание МКПК посредством центрифугирования; (d) необязательная криоконсервация МКПК; (e) необязательно оттаивание МКПК, подвергнутых криоконсервации на стадии (d); и (f) промывание МКПК с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (a)-(f) в указанном способе осуществляют по порядку.

[030] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ получения моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) от субъекта, от которого получают образец крови для производства экспрессирующих химерный

антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток), включающий следующие стадии: (а) выделение МКПК, полученных из образца крови от субъекта, причем для указанного выделения применяют систему мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (b) промывание МКПК посредством центрифугирования; (с) необязательную криоконсервацию МКПК; (d) необязательное оттаивание МКПК, подвергнутых криоконсервации на стадии (с); и (е) промывание МКПК с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (а)-(е) в указанном способе осуществляют по порядку.

[031] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ получения моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) от субъекта, от которого получают образец крови для производства экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток), включающий следующие стадии: (а) выделение МКПК из образца крови субъекта, причем образец крови подвергают лейкоферезу образца крови или получают посредством забора крови с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (b) необязательную криоконсервацию МКПК со стадии (а); (с) необязательное оттаивание МКПК со стадии (b); и (d) промывание оттаянных МКПК со стадии (с) с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (а)-(d) в указанном способе осуществляют по порядку.

[032] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ получения моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) от субъекта, от которого получают образец крови для производства экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток), включающий следующие стадии: (а) выделение МКПК из образца крови субъекта, причем образец крови подвергают лейкоферезу образца крови или получают посредством забора крови с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (b) криоконсервацию МКПК со стадии (а); (с) оттаивание МКПК со стадии (b); и (d) промывание оттаянных МКПК со стадии (с) с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления стадии (а)-(d) в указанном способе осуществляют по порядку.

[033] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ получения моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) от субъекта, от которого получают образец крови для производства экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток), включающий следующие стадии: (а) выделение моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) из образца крови субъекта с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (b) необязательную криоконсервацию и оттаивание МКПК со стадии (а); и (с) необязательное промывание оттаянных МКПК со стадии (b) с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления образец крови представляет собой подвергнутый лейкоферезу образец крови. В

конкретном варианте осуществления стадии (а)-(с) в указанном способе осуществляют по порядку.

[034] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ получения моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) от субъекта, от которого получают образец крови для производства экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток), включающий следующие стадии: (а) выделение моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) из образца крови субъекта с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК); (b) криоконсервацию и оттаивание МКПК со стадии (а); и (с) промывание оттаянных МКПК со стадии (b) с использованием системы мембранной фильтрации. В конкретном варианте осуществления образец крови представляет собой подвергнутый лейкоферезу образец крови. В конкретном варианте осуществления стадии (а)-(с) в указанном способе осуществляют по порядку.

[035] Для любых из приведенных выше вариантов осуществления Т-клетки, НК-клетки или дендритные клетки могут быть выделены из МКПК перед составлением в раствор. В более конкретных вариантах осуществления клетки в любом из указанных выше способов представляют собой экспрессирующие химерный антигенный рецептор Т-клетки (CAR-Т-клетки). В случае Т-клеток, для выделения Т-клеток можно применять магнитные бусы, такие как Dynabeads, покрытые антителами к CD3, антителами к CD4 или антителами к CD8.

[036] Различные аспекты способа производства более подробно обсуждаются ниже.

4.2. Криоконсервация

[037] МКПК или клетки, например, Т-клетки, подвергающиеся способу производства клеток, *например*, способу производства CAR-Т-клеток, описанному в данном документе, могут быть подвергнуты криоконсервации. В контексте данного документа «криоконсервация» означает консервацию клеток посредством охлаждения до температур ниже нуля, *например*, до около или менее температуры кипения жидкого азота, или -196°C . При температурах ниже нуля предпочтительно применяют криозащитные средства для предупреждения повреждения консервируемых клеток вследствие замораживания при низких температурах или нагревания до комнатной температуры. Криозащитные средства, которые можно применять, включают без ограничения диметилсульфоксид (ДМСО) (Lovelock and Bishop, Nature, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961; 190: 1204-1205), glycerol, polyvinylpyrrolidone (Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960; 85: 576) и полиэтиленгликоль (Sloviter and Ravdin, Nature, 1962; 196: 48). Предпочтительная скорость охлаждения составляет от $\sim 1^{\circ}\text{C}$ до 3°C в минуту. Через по меньшей мере два часа Т-клетки достигают температуры -80°C и могут быть помещены непосредственно в жидкий азот (-196°C) для постоянного хранения, например, в емкости для длительного криогенного хранения.

4.3. Инициирование и стимуляция культуры

[038] Т-клетки, например, немодифицированные Т-клетки или Т-клетки,

экспрессирующие CD3 и CD28, или содержащие полипептид, содержащий сигнальный домен CD3 ζ и костимулирующий домен CD28, могут быть размножены с использованием антител к CD3 и CD28, например, антител, прикрепленных к бусам; см., например, патенты США №№ 5948893; 6534055; 6352694; 6692964; 6887466; и 6905681. Для размножения Т-клеток можно применять магнитные бусы, такие как Dynabeads, покрытые антителами к CD3 и антителами к CD28.

4.4. Химерные антигенные рецепторы

[039] В определенных вариантах осуществления МКПК, *например*, иммунные клетки, более конкретно, Т-клетки, полученные в ходе осуществления способа, описанного в данном документе, экспрессируют один или более химерных антигенных рецепторов (CAR) на их поверхности. Как правило, CAR содержат внутриклеточный домен из первого белка (например, антигенсвязывающего белка), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, *например*, первичный сигнальный домен и необязательно один или более костимулирующих доменов. В предпочтительных вариантах осуществления, как только внеклеточный домен связывается с целевым белком, таким как опухоль-ассоциированный антиген (ТАА) или опухолеспецифичный антиген (TSA), через внутриклеточный сигнальный домен генерируется сигнал, который активирует иммунную клетку, например, для нацеливания и уничтожения клетки, экспрессируя целевой белок.

[040] Внеклеточные домены: Внеклеточные домены CAR связываются с представляющим интерес антигеном. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR включает рецептор или часть рецептора, который связывается с указанным антигеном. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит, или представляет собой, антитело или его антигенсвязывающую часть. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный домен содержит, или представляет собой, одноцепочечный домен Fv (scFv). Одноцепочечный домен Fv может содержать, например, V_L, связанный с V_H посредством гибкого линкера, причем V_L и V_H являются антителами, которые связывают указанный антиген.

[041] В некоторых вариантах осуществления антиген, распознаваемый внеклеточным доменом полипептида, описанный в данном документе, представляет собой опухоль-ассоциированный антиген (ТАА) или опухолеспецифический антиген (TSA). В различных конкретных вариантах осуществления опухоль-ассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген представляет собой, без ограничения, Her2, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), альфа-фетопроtein (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), раковый антиген-125 (CA-125), CA19-9, кальретинин, MUC-1, антиген созревания В-клеток (BCMA), эпителиальный мембранный белок (EMA), эпителиальный опухолевый антиген (ETA), тирозиназу, меланома-24-ассоциированный антиген (MAGE), CD19, CD22, CD27, CD30, CD34, CD45, CD70, CD99, CD117, EGFRvIII (вариант III эпидермального фактора роста), мезотелин, PAP (простатическая кислая фосфатаза), простеин, TARP (белок Т-клеточного рецептора

альтернативной рамки считывания гамма), Tgr-p8, STEAPI (шеститрансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 1), хромогранин, цитокератин, десмин, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), белок жидкости при острой кистозной болезни (GCDFP-15), антиген HMB-45, белок мелан-А (антиген меланомы, распознаваемый Т-лимфоцитами, MART-1), мио-D1, мышечно-специфичный актин (MSA), нейрофиламент, нейрон-специфическую енолазу (NSE), плацентарную щелочную фосфатазу, синаптофиз, тиреоглобулин, фактор транскрипции щитовидной железы-1, димерную форму изофермента типа M2 пируват-киназы (опухоль M2-PK), аномальный ras-белок или аномальный белок p53. В некоторых других вариантах осуществления ТАА или TSA, распознаваемые внеклеточным доменом CAR, представляют собой интегрин $\alpha\beta3$ (CD61), галактин или Ral-B.

[042] В некоторых вариантах осуществления ТАА или TSA, распознаваемые внеклеточным доменом CAR, представляют собой раково-тестикулярный антиген (CT), например, BAGE, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-ES0-1, NY-SAR-35, OY-TES-1, SPANXBI, SPA17, SSX, SYCP1 или TPTE.

[043] В некоторых других вариантах осуществления ТАА или TSA, распознаваемые внеклеточным доменом CAR, представляет собой карбогидрат или ганглиозид, например, fuc-GMI, GM2 (онкофетальный антиген-иммуногенный-1; OFA-I-1); GD2 (OFA-I-2), GM3, GD3 и подобное.

[044] В некоторых других вариантах осуществления ТАА или TSA, распознаваемые внеклеточным доменом CAR представляет собой альфа-актинин-4, Vage-1, BCR-ABL, слитый белок Bcr-Abl, бета-катенин, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, Casp-8, cdc27, cdk4, cdkn2a, CEA, coa-1, слитый белок dek-can, EBNA, EF2, антигены вируса Эпштейна-Барра, слитый белок ETV6-AML1, HLA-A2, HLA-All, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-1, 2 и 3, neo-PAP, миозин класса I, OS-9, слитый белок pml-RAR α , PTPRK, K-ras, N-ras, тризофосфатизомеразу, Gage 3,4,5,6,7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, NA-88, NY-Eso-1/Lage-2, SP17, SSX-2, TRP2-Int2, gp100 (Pmel17), тирозиназу, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, RAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15(58), RAGE, SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, HRa, HER-2/neu, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, антигены E6 и E7 вируса папилломы человека (HPV), TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 13-катенин, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, CT7, теломеразу, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68\KP1, C0-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-C0-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TAG72, TLP или TPS.

[045] В конкретном варианте осуществления опухоль-ассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген представляет собой опухолевые антиген, связанный с AML, как описано в S. Anguille et al, Leukemia (2012), 26, 2186-2196.

[046] Другие опухоль-ассоциированные и опухолеспецифические антигены

известны в данной области техники.

[047] В конкретном варианте осуществления, в котором антиген представляет собой ВСМА, химерный антигенный рецептор представляет собой ВСМА02 (см. Chekmasova et al., Blood 126:3094 (2015)). В более конкретном варианте осуществления CAR-T-клетка, экспрессирующая ВСМА02, представляет собой bb2121 или bb21217.

[048] Из уровня техники известны рецепторы, антитела и scFv, которые связываются с TSA и TAA, пригодными для конструирования рецепторов химерных антигенов, а также нуклеотидные последовательности, которые кодируют их.

[049] В некоторых конкретных вариантах осуществления антиген, распознаваемый внеклеточным доменом химерного антигенного рецептора, представляет собой антиген, который обычно не считается TSA или TAA, но который тем не менее ассоциируется с опухолевыми клетками или повреждением, вызванным опухолью. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой, например, фактор роста, цитокин или интерлейкин, например, фактор роста, цитокин или интерлейкин, связанный с ангиогенезом или васкулогенезом. Такие факторы роста, цитокины или интерлейкины могут включать, например, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF) или интерлейкин-8 (IL-8). Опухоли могут также создавать гипоксическую среду локальную по отношению к данной опухоли. Таким образом, в других конкретных вариантах осуществления антиген представляет собой фактор, связанный с гипоксией, например, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α или HIF-3 β . Опухоли могут также вызывать локализованное повреждение нормальной ткани, вызывая высвобождение молекул, известных как молекулы патоген-ассоциированного молекулярного паттерна (DAMP; также известные как алармины). Таким образом, в некоторых других конкретных вариантах осуществления антиген представляет собой DAMP, например, белок теплового шока, связанный с хроматином белок 1 высокомолекулярной группы (HMGB 1), S100A8 (MRP8, калгранулин А), S100A9 (MRP14, калгранулин В), сывороточный амилоид А (SAA) или может быть дезоксирибонуклеиновой кислотой, аденозинтрифосфатом, мочевой кислотой или сульфатом гепарина.

[050] Трансмембранный домен: В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR соединяется с трансмембранным доменом полипептида с помощью линкерной, спейсерной или петлевой полипептидной последовательности, например, последовательности из CD28 или последовательности из CTLA4. Трансмембранный домен может быть получен или быть производным из трансмембранного домена любого трансмембранного белка и может включать весь такой трансмембранный домен или его часть. В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен может быть получен или быть производным из, например, CD8, CD16, рецептора цитокинов и рецептора интерлейкина или рецептора фактора роста или тому подобного.

[051] Внутриклеточные сигнальные домены: В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR представляет собой или содержит внутриклеточный домен или мотив белка, который экспрессируется на или вблизи поверхности Т-клеток и инициирует активацию и/или пролиферацию указанных Т-клеток. Такой домен или мотив способен передавать первичный антигенсвязывающий сигнал, который необходим для активации Т-лимфоцитов в ответ на связывание антигена с внеклеточной частью CAR. Обычно этот домен или мотив содержит или представляет собой ITAM (мотив активации на основе тирозина иммунорецептора). Полипептиды, содержащие ITAM, подходящие для CAR, включают, например, цепь дзета CD3 (CD3 ζ) или ее содержащие ITAM части. В конкретном варианте осуществления внутриклеточный домен представляет собой или содержит внутриклеточный сигнальный домен CD3 ζ ; внутриклеточный сигнальный домен CD3 ζ может называться первичным сигнальным доменом. В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный домен (первичный сигнальный домен) происходит из рецепторной цепи лимфоцитов, комплексного белка TCR/CD3, субъединицы рецептора Fc или субъединицы рецептора IL-2.

[052] В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит один или более костимулирующих доменов или мотивов, например, как часть внутриклеточного домена полипептида. Один или более костимулирующих доменов или мотивов могут представлять собой или могут содержать одну или более из костимулирующей последовательности полипептида CD27 или домена, костимулирующей последовательности полипептида CD28 или домена, костимулирующей последовательности полипептида OX40 (CD134) или домена, костимулирующей последовательности полипептида 4-1BB (CD137) или домена или костимулирующей индуцибельной полипептидной последовательности Т-клеток (ICOS) или домена или другого костимулирующего домена или мотива или любой их комбинации.

[053] CAR могут также содержать мотив выживания Т-клеток. Мотив выживания Т-клеток может быть любой полипептидной последовательностью или мотивом, который облегчает выживаемость Т-лимфоцитов после стимуляции антигеном. В некоторых вариантах осуществления мотив выживания Т-клеток представляет собой или получен из CD3, CD28, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-7 (IL-7R), внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-12, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-15, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-21 или внутриклеточного сигнального домена рецептора трансформирующего фактора роста β (TGF β).

4.5. Т-клетки (Т-лимфоциты)

[054] Т-клетки, полученные посредством способов, представленных в данном документе, могут представлять собой интактные Т-лимфоциты или рестриктированные по антигенам главного комплекса гистосовместимости (МНС) Т-лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты представляют собой инфильтрирующие опухоли

лимфоциты (TIL). В определенных вариантах осуществления Т-клетки представляют собой цитотоксичные Т-клетки (цитотоксичные Т-лимфоциты или CTL), CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, эффекторные Т-клетки (T_{EFF}) или центральные Т-клетки памяти (T_{CM}).

[055] Т-клетки могут представлять собой NKT-клетки (естественные киллерные Т-клетки), которые относятся к CD1d-ограниченным Т-клеткам, которые экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR). В отличие от обычных Т-клеток, которые обнаруживают пептидные антигены, представленные обычными основными молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC), NKT-клетки распознают липидные антигены, представленные CD1d, неклассической молекулой MHC. В настоящее время распознаны два типа NKT-клеток. Инвариантные или NKT-клетки I типа экспрессируют очень ограниченный репертуар TCR - каноническую α -цепь (V α 24-J α 18 у человека), связанную с ограниченным спектром β -цепей (V β 11 у человека). Вторая популяция NKT-клеток, называемая неклассическими или неинвариантными NKT-клетками II типа, демонстрирует более гетерогенное использование TCR $\alpha\beta$. Адаптивные или инвариантные (I тип) NKT-клетки могут быть идентифицированы по экспрессии по меньшей мере одного или более из следующих маркеров: TCR V α 24-J α 18, V β 11, CD1d, CD3, CD4, CD8, α GalCer, CD161 и/или CD56.

[056] Т-клетки, полученные посредством способов, описанных в данном документе, могут представлять собой генетически модифицированные Т-клетки, например, они могут быть модифицированы для экспрессии полипептида, такого как Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR), например, один из CAR, описанный выше в разделе 4.4. Модифицированные иммунные клетки, *например*, Т-клетки, предпочтительно являются аутологичными индивидууму, которому необходимо вводить модифицированные иммунные клетки. В некоторых других вариантах осуществления модифицированные иммунные клетки предпочтительно являются аллогенными индивидууму, которому необходимо вводить модифицированные иммунные клетки. Когда аллогенные Т-клетки применяют для получения модифицированных Т-клеток, предпочтительно выбирают Т-клетки, что уменьшает вероятность появления реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) у индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления вирус-специфические Т-клетки выбраны для получения модифицированных Т-клеток; ожидается, что такие Т-клетки будут иметь значительно уменьшенную нативную способность связываться с любыми антигенами-реципиентами и, таким образом, активироваться ими. В некоторых вариантах осуществления отторжение аллогенных Т-клеток, опосредованное реципиентом, может быть уменьшено путем совместного введения хозяину одного или более иммуносупрессивных средств, например, циклоспорина, такролимуса, сиролимуса, циклофосфамида, или т. п.

[057] Модифицированные иммунные клетки, например, модифицированные Т-клетки, могут необязательно содержать «суицидальный ген» или «предохранительный переключатель», который при необходимости позволяет уничтожить по существу все модифицированные иммунные клетки. Например, модифицированные Т-клетки в

определенных вариантах осуществления могут содержать ген HSV тимидинкиназы (HSV-ТК), который вызывает гибель модифицированных Т-клеток при контакте с ганцикловиром. В другом варианте осуществления модифицированные Т-клетки содержат индуцибельную каспазу, например, индуцибельную каспазу 9 (iCaspase9), например, слитый белок между каспазой 9 и FK506-связывающим белком человека, что позволяет димеризоваться с применением специфической фармацевтической малой молекулы. См. Straathof et al., Blood 105(11):4247-4254 (2005).

4.6. Производство CAR-T-клеток

[058] В определенных вариантах осуществления любые из CAR можно вводить в любые клетки, описанные в данном документе с использованием любых способов, описанных в данном документе. В конкретном варианте осуществления способ включает следующее: активацию клеток, например Т-клеток, размножение клеток, трансдукцию клеток с использованием вектора, например, лентивирусного вектора, кодирующего CAR. В конкретном варианте осуществления клетки, например, Т-клетки, активируют с использованием антител к CD3 и антител к CD28. В конкретных вариантах осуществления антитела к CD3 и антитела к CD28 иммобилизованы посредством связывания рецепторов Fc на эндогенных антигенпредставляющих клетках, таких как моноциты и дендритные клетки. В конкретных вариантах осуществления клетки, например, Т-клетки, размножают с использованием статического мешка и/или размножения посредством биореактора WAVE (GE Healthcare Life Sciences).

4.7. Дендритные клетки

[059] Дендритные клетки (ДК), полученные посредством способов, раскрытых в данном документе, могут быть идентифицированы следующим образом. В незрелом состоянии ДК могут характеризоваться низким уровнем белков МНС и костимулирующих молекул В7, а также способностью проводить фагоцитоз и пиноцитоз, а также отсутствием поверхностных молекул CD83 и CD25. В зрелом состоянии они могут характеризоваться измененным паттерном белков клеточной поверхности, где повышена поверхностная экспрессия некоторых или всех следующих молекул: белков CD25, CD40, CD70, CD80, CD83, CD86 и МНС. «Зрелые» ДК отличаются от «незрелых» ДК тем, что первые являются иммуностимулирующе более активными, обычно сохраняют способность мигрировать в дренирующие лимфатические узлы *in vivo* и представлять все более эндогенно экспрессируемый и экзогенный антиген в контексте МНС. В физиологических условиях только «зрелые» ДК способны активировать наивные Т-клетки.

4.8. Естественные клетки-киллеры

[060] Естественные клетки-киллеры (NK), полученные посредством способов, описанных в настоящем документе, можно определить по экспрессии CD56 или CD16 и отсутствию рецептора Т-клетка (CD3). NK-клетки могут быть «адаптивными NK-клетками» или «NK-клетками памяти», данные термины являются взаимозаменяемыми, и они относятся к подмножеству NK-клеток, которые фенотипически являются CD3- и

CD56+, экспрессируют NKG2C и CD57, и необязательно, CD16, но не имеют экспрессии одного или более из следующих: PLZF, SYK, FcεRγ и EAT-2. Выделенные субпопуляции CD56+ NK-клеток, продуцируемые посредством способов, представленных в настоящем документе, могут включать экспрессию CD16, NKG2C, CD57, NKG2D, лигандов NCR, NKp30, NKp40, NKp46, активирующих и/или ингибирующих KIR, NKG2A и DNAM-1. CD56+ могут представлять собой неявную или явную экспрессию. NK-клетки, полученные посредством способов, описанных в данном документе, могут представлять собой генетически модифицированные NK-клетки, например, они могут быть модифицированы для экспрессии полипептида, такого как рецептор Т-клетка (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR).

4.9. Векторы экспрессии и трансдукция клеток

[061] Как правило, полинуклеотидные последовательности, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор, переносятся в клетку (например, Т-клетки или NK-клетки) в полинуклеотидном векторе. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирусы, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, может быть достигнута посредством функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CAR или его частей, с промотором, и включения конструкции в вектор экспрессии, подходящий для экспрессии в эукариотической клетке, *например*, Т-клетке.

[062] Вектор экспрессии, как правило, можно доставлять в клетку в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые можно применять в качестве векторов, включают без ограничения ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, лентивирусы, поксвирусы, вирус простого герпеса I и т.п. См., например, патенты США №№ 5350674 и 5585362.

[063] Как правило, подходящий вектор содержит точку начала репликации, функционирующую по меньшей мере в одном организме, последовательность промотора, удобные сайты рестрикционных эндонуклеаз и один или более выбираемых маркеров, (например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6326193).

[064] Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан ряд вирусных систем. Например, выбранный ген может быть встроен в вектор и упакован в ретровирусные частицы с использованием методик, известных в данной области техники. Затем рекомбинантный вирус можно выделить и доставить в клетки субъекта *ex vivo*. В качестве альтернативы, можно применять аденовирусные векторы.

[065] Вектор может содержать промотор и необязательно один или более

промоторных элементов, *например*, усилителей, и регулировать частоту инициации транскрипции. Обычно они расположены в области 30-110 п.о. выше стартового сайта, хотя недавно было показано, что ряд промоторов также содержат функциональные элементы ниже стартового сайта. Интервал между элементами промотора часто бывает изменчивым, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (ТК), например, интервал между элементами промотора можно увеличить до 50 п. о., прежде чем активность начнет снижаться. Последовательность промотора немедленного раннего цитомегаловируса (CMV) можно применять для управления экспрессией CAR. Эта промоторная последовательность представляет собой сильную конститутивную промоторную последовательность, способную управлять высокими уровнями экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней. Другим примером подходящего промотора является фактор роста и удлинения-1 α (EF-1 α). Однако могут также использоваться и другие последовательности конститутивного промотора, включая, помимо прочего, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинных концевых повторов (ДКП) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленный ранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Более того, настоящее изобретение не должно ограничиваться использованием конститутивных промоторов. Также можно применять индуцируемые промоторы, включая без ограничения промотор металлотионина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона или промотор тетрациклина.

[066] Для оценки экспрессии полипептида CAR на CAR-T-клетке, вводимый в клетку вектор экспрессии может также содержать селективируемый маркерный ген, репортерный ген или оба для способствования идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые необходимо подвергнуть трансфекции или инфицировать вирусными векторами. Селективируемый маркер может находиться на отдельном полинуклеотиде и совместно трансфицирован в T-клетку вместе с вектором, кодирующим CAR. Селективируемые маркеры и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями, чтобы обеспечить их экспрессию в клетке-хозяине. Подходящие селективируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как нео и т.п.

[067] Репортерные гены могут применяться для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В целом, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется в реципиентном организме или ткани и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется каким-либо легко определяемым свойством, *например*, ферментной активностью. Экспрессию репортерного гена

анализируют в подходящее время после введения полинуклеотида, кодирующего его, в реципиентные клетки. Подходящие репортерные гены могут включать в себя гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, секретрируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены, используя известные методики, или приобретены на коммерческой основе. В целом, конструкция с минимальным 5' фланкирующим участком, демонстрирующая самый высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируется как промотор. Такие промоторные участки могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки способности веществ модулировать активированную промотором транскрипцию.

[068] Способы введения и экспрессии генов в эукариотические клетки, *например*, Т-клетки, известны в данной области техники. В контексте вектора экспрессии вектор может быть легко введен в Т-клетку посредством любого способа, известного в данной области техники. Физические способы введения полинуклеотида, *например*, вектора, кодирующего CAR, в клетку-хозяина включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т.п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Предпочтительным способом введения полинуклеотида в клетку-хозяин является трансфекция фосфатом кальция.

5. ПРИМЕРЫ

5.1. Пример 1: улучшенный способ для производства CAR-T-клеток

5.1.1. Исходный способ

[069] Исходный способ производства CAR-T-клеток был разработан для направленных на ВСМА экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (см. Hullyman et al., J. Immunother. 2009, 32:169-180). Параметры способа производства, такие как выделение МКПК, активация Т-клеток, трансдукция и размножение, были изначально разработаны и оптимизированы с использованием мелкомасштабного способа на основе Т-образной колбы. После того, как параметры способа были установлены и оптимизированы, способ масштабировали для клинического производства. Способ начинали с лейкофереза с последующим выделением моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) посредством центрифугирования в градиенте плотности с использованием Cell-Saver 5+ (CS5+; Haemonetics, Braintree, Massachusetts); промывания до культивирования с использованием периодического центрифугирования культуры полученных МКПК в среде TCGM-HABS (среда для роста Т-клеток, содержащая химически определенную среду гемопоетических клеток X-VIVO-15™ (Lonza, Basel, Switzerland) без фенолового красного, с добавлением 5% об./об. сыворотки АВ человека 2 ммоль GlutaMAX™ (Gibco), 10 ммоль HEPES (4-(2-

гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (Thermo Fisher Scientific) и 300 МЕ/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (rhIL2)). Ту же среду, дополненную 1% пирувата натрия и 1% минимально необходимых витаминов, также испытывали, и было обнаружено, что она обеспечивает эквивалентное количество удвоений популяции за восемь дней. Для упрощения, для способа выбрали TCGM-HABS. После сравнения с дополнительными средами концентрация rhIL2 снизилась с 300 МЕ/мл до 100 МЕ/мл.

[070] Затем Т-клетки в МКПК были активированы с использованием растворимых антител к CD3 и антител к CD28, иммобилизованных посредством связывания с рецепторами Fc на эндогенных антигенпредставляющих клетках, таких как моноциты и дендритные клетки. Активацию Т-клеток подтверждали определением размера клетки; покоящиеся Т-клетки имеют объем ~ 180-200 фл, тогда как сильно активированные Т-клетки увеличиваются в размере до более >500 фл. За стадией активации следовало размножение в статическом мешке с последующим размножением в биореакторе WAVE (GE Healthcare Life Sciences). За размножением следовала трансдукция размноженных Т-клеток лентивирусным вектором, кодирующим CAR, нацеленный на ВСМА. На основании исследований с использованием диапазона множественности инфекции от 0,625 до 40 и мониторинга удвоения популяции, размера клеток и экспрессии CAR к ВСМА, диапазон 10-30 MOI применяли для основного клинического способа производства. Полученные клетки собирали и промывали промывкой после сбора с использованием устройства CD5+.

[071] Тем не менее, начальные стадии в исходном способе, от лейкофереза до активации Т-клеток, требовали некоторых трудоемких стадий, в частности, первоначальное выделение МКПК и зависимость от центрифугирования с градиентом промывку изменили для повышения эффективности.

5.1.2. Улучшенный способ

[072] Однородность Т-клеток является ключом к постоянству производства лекарственного препарата на основе CAR-Т-клеток. С данной целью необходимо было улучшить исходный способ посредством введения стадии выделения LOVO-АХК, начальной промывки LOVO перед культивированием и стадии финальной промывки LOVO вместо стадий, зависящих от устройства CS5+ в исходном способе.

[073] Способ выделения LOVO-АХК МКПК включал две стадии, выполняемые последовательно: промывание с использованием автоматизированной системы обработки клеток LOVO (Fresenius Kabi, Lake Zurich, Иллинойс; в данном документе называемой «LOVO»), за которой следовала инкубация с лизирующим буфером АХК (аммоний-хлорид-калиевый буфер). Буфер АХК представляет собой 150 ммоль NH₄Cl, 10 ммоль KHCO₃ и 0,1 ммоль эдетата натрия в воде (например, деионизированной воде). На стадии промывки LOVO применяли автоматизированную систему обработки клеток LOVO, которая имеет вращающуюся систему мембранной фильтрации, предназначенную для эффективного удаления тромбоцитов и клеточного дебриса, сохраняя популяции МКПК в исходном материале лейкофереза. Стадию промывки осуществляли в закрытом

предварительно стерилизованном одноразовом наборе LOVO, который включает устройство разделения клеток (вращающуюся систему мембранной фильтрации) для облегчения удаления тромбоцитов, клеточного дебриса и плазмы.

[074] После стадии промывки LOVO к оставшейся клеточной суспензии добавляли буфер АХК для лизиса эритроцитов. Данную стадию осуществляют в мешке для переноса с поверхностью контакта с клетками из поливинилхлорида. Затем истощенные по эритроцитам МКПК отделяли от буферного раствора АХК и промывали посредством центрифугирования.

[075] Затем выделенные и промытые МКПК необязательно подвергали криоконсервации (если их необходимо транспортировать перед применением) с использованием стандартных методик криоконсервации и замораживания с контролируемой скоростью. Клетки оттаивали в ванне с температурой 37° непосредственно перед последующим применением. В трех сериях испытания криоконсервированные клетки продуцировали адекватное количество Т-клеток, а после производства CAR-T-клеток - CAR+Т-клеток.

Партия МКПК	Общее содержание произведенных Т-клеток	% CAR+	Общее содержание CAR+Т-клеток
3101	$1,32 \times 10^{10}$	29,4%	$3,88 \times 10^9$
3167	$6,05 \times 10^9$	22,5%	$1,36 \times 10^9$
3219	$5,76 \times 10^9$	23,8%	$1,37 \times 10^9$

[076] После оттаивания МКПК подвергали культивированию клеток, включающему инициацию культивирования и стимуляцию антителами к CD3 и CD28 (день 0); трансдукцию Т-клеток лентивирусным вектором, несущим кодирующие последовательности химерного антигенного рецептора к ВСМА (день 1); подсчет клеток и пересев в газопроницаемые мешки для культивирования клеток (дни 2-5); подсчет клеток и повторный пересев в биореакторе WAVE™ (дни 6-9); последующий сбор клеток и заключительную промывку с использованием устройства LOVO (день 10).

[077] Таким образом, заключительные стадии улучшенного процесса LOVO-АХК являются следующими:

Лейкаферез;

Выделение LOVO-АХК МКПК;

Промывание МКПК посредством центрифугирования;

Криоконсервация МКПК (при необходимости транспортировки);

Оттаивание МКПК (при необходимости транспортировки);

Промывание МКПК с использованием LOVO

Активация Т-клеток, размножение и сбор клеток;

Промывание с использованием LOVO.

[078] Усовершенствованный способ имел преимущества по сравнению с исходным способом, включающим закрытые стадии способа (снижение вероятности загрязнения);

повышенную надежность и воспроизводимость препаратов МКПК; сокращение времени производства лекарственного препарата; и снижение общей сложности способа.

5.2. Пример 2: Исследования преимущества улучшенного способа

[079] Сравнение исходного способа выделения и способа выделения LOVO-АХК

[080] Данный пример показывает, что по некоторым параметрам улучшенный способ превосходит исходный способ.

[081] Техничко-экономическое обоснование, в котором сравнивали исходный способ выделения CS5+МКПК со способом выделения LOVO-АХК МКПК, осуществляли с единицами лейкофереза от 3 здоровых доноров и 2 субъектов с множественной миеломой (ММ). После параллельного выделения МКПК с использованием исходного способа и способа LOVO АХК, выделенные МКПК подвергали криоконсервации и обрабатывали с использованием той же культуры клеток, состава DP и способов криоконсервации. Как обобщено ниже, жизнеспособность и фенотипический состав МКПК, субпопуляции МКПК CD4+ и CD8+ Т-клеток, характеристика клеточной культуры и результаты испытаний на высвобождение лекарственного препарата показали, что способ выделения LOVO-АХК является возможной заменой процедуры выделения CS5+МКПК.

[082] Выделение и извлечение МКПК

[083] Стадия выделения МКПК предназначена для удаления эритроцитов (RBC) и тромбоцитов (PLT) из исходного материала лейкофереза. Как показано в Таблице 1, обновленный способ выделения МКПК обеспечивал более обширное и последовательное снижение уровня эритроцитов (RBC) и истощение тромбоцитов (PLT), таким образом улучшая качество МКПК для инициации культивирования клеток.

Таблица 1 - Сравнение исходных или после изменения МКПК RBC/WBC и PLT/WBC

Донорская партия	Удаление RBC из МКПК			Удаление PLT из МКПК		
	Исходный способ (RBC/WBC)	Обновленный способ (RBC/WBC)	Отличие исходных и последующих изменений	Исходный способ (PLT/WBC)	Обновленный способ (PLT/WBC)	Отличие исходных и последующих изменений
1	4	1	-3	18	1	-17
2	5	2	-3	28	1	-27
3	4	2	-2	19	1	-18
4	4	2	-2	36	0	-36

5	2	1	-1	13	0	-13
Среднее значение	4	2	-2	23	1	-22

Значения=процентное содержание общего количества клеток

[084] Поскольку в двух способах получения МКПК применяли разные устройства для выделения МКПК, оценивали и сравнивали выход клеток, полученный на стадии выделения МКПК. Как показано в Таблице 2, выходы извлечения МКПК в исходном и обновленном способах были очень схожими, со средней разницей предварительного и последующего изменения в -2 процента.

Таблица 2 - Сравнение извлечения МКПК

Донорская партия	Выделение и извлечение МКПК		
	Исходный способ (%)	Обновленный способ (%)	Отличие исходных и последующих изменений
1	82	86	4
2	70	73	2
3	87	78	-9
4	61	59	-2
5	73	69	-4
Среднее значение	75	73	-2

Таким образом, улучшенный способ показал выделение и извлечение МКПК и удаление RBC; и превосходное удаление тромбоцитов по сравнению с исходным способом.

[085] Характеристика клеточной культуры в ходе способа производства - сравнение роста Т-клеток и пика активации Т-клеток

[086] Результаты характеристики клеточных культур представлены в Таблице 3. Т-клетки, полученные из исходных и обновленных способов, демонстрировали сравнимую кинетику роста, о чем свидетельствует схожая степень роста Т-клеток (средняя разница в росте Т-клеток до и после изменений составляет -1 удвоения популяции) и профиль активации (средний день пика активации до и после изменения в культуре клеток является одинаковым).

Таблица 3 - Рост Т-клеток и пик активации Т-клеток в днях в клеточной культуре

Партия CAR-T- клеток к ВСМА	Рост Т-клеток (PDL Т-клеток при сборе)			Время пика активации (День в клеточной культуре)		
	Исходный способ	Обновленный способ	Отличие исходных и последующих изменений	Исходный способ	Обновленный способ	Отличие исходных и последующих изменений
1	8	7	-1	День 3	День 3	День 0
2	11	11	0	День 4	День 4	День 0
3	7	7	0	День 5	День 4	День -1
4	9	8	-1	День 4	День 4	День 0
5	9	8	-1	День 3	День 4	День 1
Среднее значение	9	8	-1	День 4	День 4	День 0

[087] Результаты характеристики лекарственных препаратов в ходе способа производства - извлечение после промывания после сбора

[088] Поскольку в двух способах производства лекарственных препаратов для стадии промывания после дня 10 сбора применяли разные устройства, оценивали и сравнивали выход клеток, полученный на стадии промывки после сбора. Как показано в Таблице 4, извлечение после промывки при сборе лекарственного препарата (CAR-T-клеток), полученное в результате обновленного способа, было заметно улучшено по сравнению с исходным способом, с наблюдаемым средним увеличением на 30 процентов.

Таблица 4 - Извлечение после промывки при сборе

ID партии МКПК	Извлечение после промывки при сборе		
	Исходный способ (%)	Обновленный способ (%)	Отличие исходных и последующих изменений
1	63	93	30
2	77	94	17
3	63	101*	38

4	71	97	26
5	52	88	36
Среднее значение	65	95	30

* Значение превышает 100 вследствие ошибки измерения.

[089] Таким образом, улучшенный способ показывает заметно улучшенное извлечение CAR-T-клеток по сравнению с исходным способом.

5.3. Пример 3: Сравнительные исследования преимущества способов

[090] Данный пример демонстрирует, что по другим параметрам улучшенный способ сопоставим с исходным способом.

[091] Исходный и улучшенный способы выделения МКПК сравнивали и определяли для получения эквивалентных результатов следующим образом. Условия изменения способа приведены в Таблице 5. Для каждого здорового донора единицу лейкофереза разделяли поровну для исходного устройства CS5+ и обновленных способов выделения МКПК «LOVO-АХК». После стадии выделения МКПК партии МКПК либо криоконсервировали, либо применяли для инициации культивирования клеток без криоконсервации. Перед инициацией клеточной культуры МКПК промывали периодическим центрифугированием или устройством для обработки клеток LOVO. Газопроницаемые мешки для культивирования клеток применяли на протяжении всего периода культивирования клеток. В день 10 после сбора лекарственный препарат промывали либо устройством CS5+, либо устройством обработки клеток LOVO. Составленный лекарственный препарат замораживали в мешках для доклинической оценки сопоставимости *in vivo* и анализа стабильности после оттаивания или во флаконах для оценки сопоставимости *in vitro*.

Таблица 5 - Условия изменения способа для оценки сопоставимости

ID условия	Описание	Условия способа		
		Стадия способа: Получение МКПК		Стадия способа: Составление и криоконсервация лекарственных препаратов
		Действие: Выделение МКПК	Действие: Промывание перед инициацией клеточной культуры	Действие: Промывание после сбора

1	Исходный способ	Центрифугирование с плотностью фиколла с устройством CS5+	Центрифугирование серии	Устройство CS5+
2	Обновленный способ	Способ LOVO-АХК	Н/Д (часть способа LOVO-АХК) в отсутствие стадии удержания МКПК Устройство для обработки клеток LOVO в присутствии стадии удержания МКПК с замораживанием	Устройство для обработки клеток LOVO

[092] Исследование сопоставимости проводили с пятью единицами лейкафереза здоровых доноров, от которых было получено десять партий CAR-T-клеток к ВСМА (до и после изменения способа в каждом случае).

[093] Каждую из стартовых единиц лейкафереза разделяли и обрабатывали для выделения МКПК параллельно с исходным и обновленным способами. Три из пяти партий МКПК криоконсервировали с последующим оттаиванием и иницированием культивирования клеток, в то время как оставшиеся две партии МКПК немедленно обрабатывали для инициации культивирования клеток без замораживания. Ранее была установлена сопоставимость криоконсервированных (стадия удержания МКПК) и свежих (стадия удержания МКПК) МКПК в способе производства CAR-T-клеток к ВСМА. По окончании культивирования клеток исходный и обновленный способы продолжали стадиями сбора и обработки лекарственного препарата, включая соответствующие способы промывки клеток. Испытательные образцы лекарственного препарата по ходу способа производства и криоконсервированные образцы, полученные с использованием исходных и обновленных способов, оценивали в соответствии с планом сравнительных аналитических испытаний, как описано ниже.

[094] Сравнительные аналитические испытания

[095] Результаты сравнения жизнеспособности МКПК представлены в Таблице 6. Устойчивая разница в жизнеспособности отсутствовала, при этом средняя разница до и после изменения составляла +2 процента.

Таблица 6 - Сравнение жизнеспособности МКПК в до или после изменений в способе

Партия МКПК	Жизнеспособность МКПК		
	Исходный способ (%)	Улучшенный способ (%)	Отличие исходных и последующих изменений
1	95	97	2
2	95	97	2
3	97	97	0
4	95	96	1
5	95	96	1
Среднее значение	95	97	2

[096] Сравнение композиции МКПК

[097] Результаты сравнения композиции МКПК представлены в Таблице 7 для лейкоцитов CD45+, CD3+CD56- Т-клеток, CD14+ моноцитов и в Таблице 8 для CD19+ В-клеток, CD3-CD56+ НК-клеток и CD56-CD16+ гранулоцитов, соответственно. Композиции МКПК были сопоставимы, так как средние различия в содержании CD45+ лейкоцитов, CD3+CD56- Т-клеток, CD14+ моноцитов, CD19+ В-клеток и CD3-CD56+ НК-клеток были +1, +2, +1, -1 и -1 процента, соответственно до и после изменения Ни в одном из способов не наблюдалось значительного присутствия CD56-CD16+ гранулоцитов (не обнаружено). В целом, композиции МКПК были сопоставимыми в исходном и обновленном способах.

Таблица 7 - композиция МКПК: CD45+ лейкоциты, CD3+CD56- Т-клетки, CD14+ моноциты

Партия	CD45+ лейкоциты			CD3+CD56-Т-клетки			CD14+ моноциты		
	Гейтированы на жизнеспособных клетках			Гейтированы на CD45+ лейкоците			Гейтированы на CD45+ лейкоцитах		
	Исходный способ (%)	Обновленный способ (%)	Отличие исходных и последующих изменений	Исходный способ (%)	Обновленный способ (%)	Отличие исходных и последующих изменений	Исходный способ (%)	Обновленный способ (%)	Отличие исходных и последующих изменений
1	95	97	2	57	61	4	20	17	-3
2	98	97	-1	41	48	7	28	24	-4
3	96	96	0	41	36	-5	31	40	9
4	94	96	2	20	20	0	42	45	3
5	95	97	2	43	45	2	30	31	1
Среднее значение	96	97	1	40	42	2	30	31	1

Таблица 8 - композиция МКПК: CD19+ В-клетки, CD3-CD56+ NK-клетки, CD56-CD16+ гранулоциты

Партия МКПК	CD19+ В-клетки			CD3-CD56+ NK-клетки			CD56-CD16+ гранулоциты		
	Гейтированы на жизнеспособных клетках			Гейтированы на CD45+ лейкоцитах			Гейтированы на CD45+ лейкоцитах		
	Исходный способ (%)	Обновленный способ (%)	Отличие исходных и последующих изменений	Исходный способ (%)	Обновленный способ (%)	Отличие исходных и последующих изменений	Исходный способ (%)	Обновленный способ (%)	Отличие исходных и последующих изменений
1	7	9	2	10	9	-1	0	0	0
2	16	15	-1	8	7	-1	0	0	0
3	11	6	-5	9	10	1	0	0	0
4	8	7	-1	21	21	0	0	0	0
5	7	6	-1	11	11	0	1	0	-1
Среднее значение	10	9	-1	12	11	-1	0	0	0

[098] Сравнение экспрессии CD4+ и CD8+ Т-клеток МКПК

[099] Популяцию МКПК Т-клеток дополнительно характеризовали для экспрессии CD4+ и CD8+. Как показано в Таблице 9, субпопуляция CD4+/CD8+ Т-клеток МКПК была сопоставима между двумя способами, при этом средняя разница до и после изменения для клеток CD4+ и CD8+ в популяции Т-клеток составляла -3 и +3 процента, соответственно.

Таблица 9 - Субпопуляции CD4+ и CD8+ Т-клеток МКПК

Партия МКПК	CD4+ Т-клетки			CD8+ Т-клетки		
	Гейтированы на CD3+CD56-Т-клетках			Гейтированы на CD3+CD56-Т-клетках		
	Исходный способ (%)	Обновленный способ (%)	Отличие исходных и последующих изменений	Исходный способ (%)	Обновленный способ (%)	Отличие исходных и последующих изменений
1	63	60	-3	29	34	5
2	69	68	-1	27	28	1
3	68	66	-2	24	24	0
4	68	65	-3	26	28	2
5	50	45	-5	41	47	6
Среднее значение	64	61	-3	29	32	3

[0100] Наблюдали различия между данными лейкоцитарного состава нормальных доноров МКПК, полученные для оценки сопоставимости изменений данного способа, и данными МКПК пациентов с множественной миеломой (ММ) из предыдущего исследования. По сравнению со здоровыми донорами, МКПК пациентов с ММ содержат меньшее количество В-клеток и Т-клеток и повышенное количество моноцитов.

[0101] Кроме того, соотношение CD4+/CD8+ в популяции Т-клеток также было различным. При использовании исходного способа, среднее (N=5) процентное содержание В-клеток, Т-клеток и моноцитов в партиях МКПК здоровых доноров составило 9,7% ± 4,2%, 40,6% ± 13,1%, 30,0% ± 7,8%, соответственно. Среднее (N=5) соотношение CD4+/CD8+ Т-клеток в партиях МКПК здоровых доноров составило 58,8%/32,7% Т-клеток. С использованием того же исходного способа для получения МКПК, среднее (N=24) процентное содержание В-клеток, Т-клеток и моноцитов в партиях CRB-401 МКПК составило 1,9% ± 1,5%, 29,9% ± 15,7%, 56,4% ± 19,4%, соответственно. Среднее (N=24) соотношение CD4+/CD8+ Т-клеток в партиях МКПК CRB-401 составило 40,8%/54,4% Т-клеток. Такие наблюдаемые различия в двух наборах данных не были связаны с изменением способа и соответствовали тем, о которых сообщалось в научной литературе.

[0102] Таким образом, по указанным выше параметрам улучшенный способ

сопоставим с исходным способом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ производства экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток) из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) субъекта, от которого получают образец крови, включающий следующие стадии:

получение МКПК из образца крови;
выделение МКПК, которые были получены из образца крови с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК);
промывание МКПК посредством центрифугирования;
необязательная криоконсервация МКПК;
необязательное оттаивание МКПК, подвергнутых криоконсервации на стадии (d);
промывание МКПК с использованием системы мембранной фильтрации;
производство CAR-Т-клеток из МКПК со стадии (f); и
промывание CAR-Т-клеток со стадии (g) с использованием системы мембранной фильтрации.

2. Способ производства экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток) из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) из подвергнутого лейкоферезу образца крови от субъекта, включающий следующие стадии:

выделение МКПК из подвергнутого лейкоферезу образца крови с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК);
криоконсервация МКПК со стадии (a);
оттаивание МКПК со стадии (b);
промывание оттаянных МКПК со стадии (c) с использованием вращающейся системы фильтрации;
производство CAR-Т-клеток из МКПК со стадии (d); и
промывание CAR-Т-клеток со стадии (e) с использованием системы мембранной фильтрации.

3. Способ производства экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-Т-клеток) из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) образца крови субъекта, включающий следующие стадии:

выделение МКПК из образца крови с использованием системы мембранной фильтрации и аммоний-хлорид-калиевого буфера (АХК);
криоконсервация и оттаивание МКПК со стадии (a);
промывание оттаянных МКПК со стадии (b) с использованием системы мембранной фильтрации;
производство CAR-Т-клеток из МКПК; и
промывание CAR-Т-клеток с использованием вращающейся системы мембранной фильтрации.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что любая или все системы мембранной фильтрации представляет собой вращающуюся систему мембранной фильтрации.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что вращающаяся система мембранной фильтрации представляет собой автоматизированную систему обработки клеток LOVO.

6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что буфер АХК содержит 50-300 ммоль хлорида аммония, 5-25 ммоль карбоната калия и 0,05-0,25 ммоль эдетата натрия.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанный буфер АХК содержит 150 ммоль хлорида аммония, 10 ммоль карбоната калия и 0,1 ммоль эдетата натрия.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный способ улучшает снижение уровня тромбоцитов и эритроцитов в указанных МКПК на 18%-36% по сравнению с тем же способом с использованием центрифугирования в градиенте плотности вместо каждого применения мембранной фильтрации.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что указанный способ улучшает извлечение CAR-T-клеток после производства CAR-T-клеток на 17%-36% по сравнению с тем же способом с использованием центрифугирования в градиенте плотности вместо каждого применения мембранной фильтрации.

По доверенности